



1150090608

T/UNICAMP
M437s
BCCL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Victor Gonçalves Maturana

Subpatótipos de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)

podem estar associados às síndromes infecciosas causadas no

hospedeiro

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Victor Gonçalves Maturana
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

Campinas, 2010

Campinas, 08 de outubro de 2010

BANCA EXAMINADORA

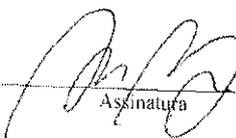
Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Profa. Dra. Janaina Luísa Leite Garbin

Assinatura

Prof. Dr. Gerson Nakazato

Assinatura

Dedico este trabalho a minha mãe, Silvana, e a meu pai, Paulo, os quais, embora não saibam, abriram mão de realizar seus sonhos para que eu pudesse viver os meus.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Dr. Wanderley pela orientação e pela amizade que foi além das obrigações profissionais.

Agradeço ao Professor Dr. Marcelo Palma por toda orientação, apoio e paciência.

Agradeço à Mestra Camila e ao Mestre Mathias, ambos brilhantes, amigos e solícitos.

Agradeço à Professora Dra. Eliana Stehling pelos conselhos nos momentos de dúvida.

Agradeço ao Professor Dr. Marcelo Lancelotti por toda colaboração.

Agradeço às amigas Fernanda Pace, Cristiane Mobilon e Fernanda Paganeli, que estiveram por perto, ajudaram e tornaram mais alegres os dias sobre a bancada.

Agradeço aos colegas Ricardo, Sandra e Isildinha, guardiões de um ambiente de trabalho organizado.

Agradeço aos amigos Renê e Tiago, que compartilharam os mesmos anseios ao longo do mesmo caminho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| Índice de Tabelas | ix |
| Índice de Figuras | x |
| Resumo | xi |
| Abstract | xii |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica para Aves (APEC) | 1 |
| 1.2 Ilhas de Patogenicidade | 4 |
| 1.3 Biofilme e “ <i>Quorum sensing</i> ” | 7 |
| 2. Objetivos | 10 |
| 3. Material e Métodos | 11 |
| 3.1 Linhagens Bacterianas | 11 |
| 3.2 Soluções, meios de cultura e condições de cultivo | 12 |
| 3.2.1 Meio Luria Bertani (LB) | 12 |
| 3.2.2 <i>Solução de Hogness</i> | 12 |
| 3.2.3 <i>Solução de EDTA 0,5M pH 8,0</i> | 13 |
| 3.2.4 <i>Tampão Tris-Borato-EDTA 5X (TEB)</i> | 13 |
| 3.2.5 Gel de agarose | 13 |
| 3.2.6 Solução de brometo de etideo (0,5µg/mL) | 13 |
| 3.2.7 Condições de cultivo | 14 |
| 3.3 Extração de DNA | 14 |
| 3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 14 |
| 3.5 Iniciadores | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Grupos Filogenéticos | 17 |
| 3.7 Genes de Virulência | 18 |
| 3.8 Ilhas de Patogenicidade | 18 |
| 3.9 Teste de Patogenicidade: Dose Letal 50% (LD ₅₀) | 18 |
| 3.10 Ensaio de formação de biofilme | 19 |
| 3.11 Produção de molécula auto-indutora de <i>Quorum sensing</i> | 20 |
| 3.12 Teste de adesão em células HeLa e Hep-2 | 21 |
| 3.13 Teste de Adesão em Células Epiteliais de Traquéia | 22 |
| 3.14 Análise Estatística | 22 |
| 3.14.1 Análise de Correspondência (CA) | 23 |
| 3.14.2. Teste G | 23 |
| 3.14.3 Análise de Componente Principal (PCA) | 23 |
| 3.14.4 Algoritmo “K-means” | 23 |
| 3.14.5 Análise de Função Discriminante (DA) | 24 |
| 3.15 Rede Complexa | 24 |
| 4. Resultados | 26 |
| 4.1 Grupos Filogenéticos | 26 |
| 4.2 Genes de Virulência | 27 |
| 4.3 Ilhas de Patogenicidade | 32 |
| 4.4. Teste de Patogenicidade: Dose Letal 50% (LD ₅₀) | 32 |
| 4.5. Ensaio de formação de biofilme | 33 |
| 4.6. Produção de molécula auto-indutora de <i>Quorum sensing</i> | 35 |
| 4.7 Teste de adesão em células HeLa e Hep-2 | 36 |
| 4.8. Teste de Adesão em Células Epiteliais de Traquéia | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9. Análise Estatística | 38 |
| 4.9.1. Análise de Correspondência (CA) | 38 |
| 4.9.2. Teste G | 39 |
| 4.9.3. Análise de Componente Principal (PCA) | 39 |
| 4.9.4. Algoritmo “K-means” | 41 |
| 4.9.5. Análise de Função Discriminante (DA) | 43 |
| 4.10. Rede Complexa | 47 |
| 5. Discussão | 49 |
| 6. Conclusões | 56 |
| 7. Referências Bibliográficas | 57 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR. | 16 |
| Tabela 2. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária alocadas dentro de cada grupo filogenético (A, D, B1 e B2). | 26 |
| Tabela 3. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária alocadas dentro do grupo considerado patogênico (B2+D) e do grupo considerado não patogênico (A+B1). | 27 |
| Tabela 4. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de adesinas detectados por PCR. | 28 |
| Tabela 5. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de captação de ferro detectados por PCR. | 28 |
| Tabela 6. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de ilhas de patogenicidades detectados por PCR. | 32 |
| Tabela 7. Dose letal 50% (DL ₅₀) das amostras de <i>E. coli</i> de origem aviária estudadas. | 33 |
| Tabela 8. Número de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os testes de adesão em células HeLa, Hep-2 e em células epiteliais de traquéia, na presença e ausência de manose. | 38 |
| Tabela 9. Análise de Componente Principal (PCA). | 41 |
| Tabela 10. Composição dos dois grupos obtidos pelo algoritmo K-means. | 42 |
| Tabela 11. Composição dos três grupos obtidos pelo algoritmo K-means. | 42 |
| Tabela 12. Composição dos quatro grupos obtidos pelo algoritmo K-means. | 42 |
| Tabela 13. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os grupos N, S, H e O. | 43 |
| Tabela 14. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os níveis de patogenicidade – baixo, médio e alto – obtidas pelos testes de LD ₅₀ . | 43 |
| Tabela 15. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os 3 grupos obtidos pelo algoritmo K-means. | 44 |
| Tabela 16. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os grupos AFEC e APEC. | 44 |

Índice de Figuras

- Fig. 1.** Árvore de decisão dicotomizada para determinação do grupo filogenético de linhagens *E. coli*. 17
- Fig. 2** Número de genes (de 0 a 5) de adesinas apresentado por cada grupo de linhagens, em porcentagens. 29
- Fig. 3** Número de genes (de 0 a 4) de captação de ferro apresentado por cada grupo de linhagens, em porcentagens. 30
- Fig. 4** Número de genes (de 0 a 4) de virulência apresentado por cada grupo de linhagens, em porcentagens. 31
- Fig. 5.** Teste de formação de biofilme utilizando Cristal Violeta. 34
- Fig. 6.** Teste de formação de biofilme utilizando Cristal Violeta. 34
- Fig. 7.** Teste de formação de biofilme utilizando Cristal Violeta. 35
- Fig. 8:** Verificação da produção de autoindutor AI-3 utilizando ensaio da enzima β -galactosidase. 36
- Fig. 9.** Análise de Correspondência (CA) dos 24 traços estudados. 39
- Fig. 10.** Análise de componente principal (PCA) dos 24 traços estudados. 40
- Fig. 11.** Análise de componente principal (PCA) dos 24 traços estudados, excluindo-se as amostras septicêmicas (S). 46
- Fig. 12.** Representação em rede da ocorrência de cada característica biológica analisada nas linhagens de *E. coli*. 48

Resumo

Escherichia coli patogênica para aves (APEC) causa diferentes tipos de infecções sistêmicas extraintestinais nestes hospedeiros, coletivamente denominadas colibaciloses, causando grandes prejuízos econômicos à indústria aviária. Essas doenças incluem, dentre outras, septicemia, onfalite, celulite e síndrome da cabeça inchada. Entretanto, não há até o momento uma descrição de genes ou características que permitam classificar as linhagens aviárias em patótipos responsáveis por causar doenças específicas em seus hospedeiros, a semelhança do que ocorre para linhagens de *E. coli* patogênicas para seres humanos. O objetivo deste estudo foi caracterizar linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária representantes de 4 grupos, sendo um grupo de linhagens comensais (AFEC – sigla em inglês para “Avian Fecal *Escherichia coli*”) e três grupos de linhagens patogênicas, causadoras de três síndromes diferentes em seus hospedeiros (septicemia, síndrome da cabeça inchada e onfalite). Para o trabalho, as características biológicas estudadas foram: adesão em células eucarióticas, formação de biofilme, produção de molécula sinalizadora de *quorum sensing*, presença de genes de ilhas de patogenicidade, dose de letalidade (LD_{50}), grupo filogenético e presença de genes de virulência. A comparação entre as diferentes linhagens com base nestes traços genotípicos e fenotípicos, por meio de diferentes ferramentas de estatística multivariada além de redes complexas, permitiu inferir a estrutura populacional do grupo estudado. Os resultados indicam que APEC não constitui um grupo homogêneo, mas um conjunto estruturado de diferentes subgrupos, cada um associado a uma síndrome infecciosa específica causada no hospedeiro, possivelmente definindo diferentes patótipos ou subpatótipos dentro de linhagens APEC. Assim, sugerimos a existência de um subpatótipo associado à onfalite, com características de letalidade semelhantes as de linhagens AFEC, mas com um padrão de adesão diferente, que pode ser atribuído a uma especialização do grupo relacionada a colonização de um nicho particular, o saco da gema do ovo. E um subpatótipo associado à síndrome da cabeça inchada, igualmente adaptado à patogenicidade, mas com características mais “agressivas” evidenciadas pelos altos índices de letalidade, grande número de genes de virulência e altos índices de adesão. Linhagens associadas à septicemia, contudo, não constituem um grupo coeso, sugerindo tratar-se de uma miscelânea de linhagens que podem pertencer a diferentes subpatótipos e que em última instância geram a síndrome sistêmica (septicemia), devido à evolução do quadro clínico e/ou às condições imunológicas do hospedeiro. Este trabalho é pioneiro em demonstrar a existência de subpatótipos dentro de linhagens APEC, relacionando diferentes síndromes infecciosas com grupos específicos de linhagens as quais possuem características fenotípicas e genotípicas particulares. Tais resultados abrem novas possibilidades no estudo de genes responsáveis pelos diferentes processos de patogênese em APEC, bem como no desenvolvimento de vacinas. Talvez seja importante considerar estes subgrupos no desenvolvimento de vacinas, com o intuito de produzir vacinas com proteção cruzada, o que ainda não foi atingido com sucesso para linhagens APEC.

Abstract

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) cause different types of systemic extraintestinal infections in poultry, which are collectively termed colibacillosis, imposing significant economic losses for the avian industry. Among these diseases are septicaemia, omphalitis, cellulitis and swollen head syndrome. However, to the date, there is no description of genes or characteristics which allow us to classify avian strains in pathotypes responsible for causing specific diseases in their hosts, as there are for human pathogenic *E. coli* strains. In this study we aimed to characterize avian pathogenic *E. coli* strains representing 4 groups, one of commensal strains (AFEC – Avian Fecal *Escherichia coli*) and 3 groups of pathogenic strains responsible for causing 3 different syndromes in their hosts (septicaemia, omphalitis and swollen head syndrome). The biological characteristics studied were: adhesion to eukaryotic cells, biofilm formation, capacity of synthesizing *quorum sensing* signaling molecule, presence of pathogenicity island, pathogenicity levels according to lethal dose (50%) assay, phylogenetic group and presence of virulence genes. The comparison between strains based on these genotypic and phenotypic traits, by different multivariate statistics tools and complex network, allowed us to infer the population structure of the studied group. The results indicate that APEC do not constitute a unique homogeneous group, but a structured set of different subgroups, each one associated to a specific infectious syndrome inflicted to the host, possibly defining pathotypes or subpathotypes within APEC strains. Thus, we suggest the existence of a subpathotype associated to omphalitis, with lethality characteristics similar to AFEC strains, but with a different adhesion pattern, which may be due to a specialization related to the colonization of a particular niche, the egg's yolk sac. And a subpathotype associated to the swollen head syndrome, equally adapted to pathogenicity, but with more “aggressive” characteristics demonstrated by the high lethality and adhesion levels. Septicaemic strains, however, do not constitute a cohesive group, which suggests a constellation of strains associated to different subpathotypes and capable of, eventually, cause a systemic syndrome (sepsis), due to the clinical evolution of the illness and/or host immunological conditions. This work is pioneer in demonstrating the existence of subpathotypes within APEC strains, relating different infectious syndromes to specific groups of strains possessing particular genotypic and phenotypic characteristics. These results offer new possibilities in studying the genes responsible for different pathogenesis processes within APEC and for the vaccine developing. It may be important to consider these subgroups in the process of vaccine developing, in the efforts for obtain cross protection, which had not yet being accomplished successfully concerning APEC strains.

1. Introdução

1.1. *Escherichia coli* patogênica para Aves (APEC)

A indústria avícola possui grande importância na economia brasileira. Segundo dados de 2009, a produção foi de 12 milhões de toneladas de carne de frango, colocando o Brasil como o segundo maior produtor mundial de carne de frango, ficando apenas atrás dos Estados Unidos da América (EUA). Embora a maior parte da produção seja consumida internamente, 1/3 da mesma é exportada para quase cem países, tornando o Brasil o segundo maior exportador mundial. A importância do setor na economia brasileira é de grande relevância, uma vez que a carne de frango constitui o quarto maior item de exportação (terceiro, se considerarmos apenas os itens básicos), de forma que o setor emprega 4,8 milhões de pessoas e movimenta cerca de 5,8 bilhões de dólares (Fonte: ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). Assim, a indústria avícola é importante para as economias interna e exportadora brasileiras, gerando empregos, alimentos de alto valor proteico, com relativo baixo custo e gerando divisas em moedas fortes (dólares e euros). Apesar de ser um importante segmento econômico, a indústria avícola, como os demais ramos da pecuária e agricultura, está sujeita a fatores que podem afetar de maneira significativa os seus rendimentos e custos.

Entre os fatores que podem causar a diminuição da produtividade, e aumento de custo, destacam-se as infecções causadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias e fungos). Entre estes microrganismos, as bactérias, principalmente *Escherichia coli*, são agentes significativos de morbidade e mortalidade (Gross, 1991).

A bactéria *Escherichia coli*, (bacilo gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, anaeróbio facultativo) é um integrante regular da microbiota do trato gastrointestinal de muitos animais, incluindo mamíferos e aves, atuando de maneira importante na manutenção da fisiologia intestinal (Amhaz *et al.*, 2004). Pode, entretanto, causar várias doenças infecciosas dependendo da presença de genes de virulência (Levine, 1987; Nataro & Kaper, 1998) e das condições ambientais e do sistema imunológico do organismo hospedeiro (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas, por alguns pesquisadores, em dois grandes grupos: as causadoras de

doenças intestinais, e as causadoras de doenças extra-intestinais (Johnson & Russo, 2002; Nataro & Kaper, 1998), sendo, também, classificadas de acordo com o hospedeiro que infectam (Gyles, 1994).

As linhagens patogênicas de *E. coli* relacionadas a doenças em aves são coletivamente denominadas APEC (do inglês, “Avian Pathogenic *Escherichia coli*”), apresentando algumas características principais em comum: podem ser classificadas de acordo com os principais sorogrupos O associados às doenças, especialmente os sorogrupos O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 ou O115; habilidade de expressar um ou mais tipos de adesinas (tipo 1 com suas variantes, fimbria P e fimbria “curli”, hemaglutinina sensível à temperatura, *tsh*); presença de cápsula de polissacarídeo; produção de sistemas de seqüestro de ferro; resistência ao poder bactericida do soro do hospedeiro e produção de toxinas e citotoxinas (Fantinatti *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 2002a; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). A maioria das linhagens está associada a infecções extra-intestinais, sendo o termo “colibaciloses” empregado para englobar o grande número de doenças existentes, dentre as quais: septicemia, celulite, pericardite, perihepatite, onfalite, peritonite, infecções do trato respiratório e de gema dos ovos, e síndrome da cabeça inchada (Gyles, 1994). Acredita-se que, exceto para as infecções da gema do ovo, todas estas infecções requerem fatores predisponentes, que incluem condições ambientais e infecções primárias, principalmente virais, o que faz com que se acredite que estas amostras de APEC atuem como agentes patogênicos secundários (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Devido a essas infecções, linhagens APEC causam grandes perdas econômicas na produção de aves domésticas para a alimentação devido à morbidade, à mortalidade, queda na produção, condenação de carcaças infectadas, tanto em países desenvolvidos, como os EUA, quanto em países em desenvolvimento, como o Brasil. Buscam-se, assim, formas de prevenir e controlar tais infecções nos animais, através da implementação de técnicas de higienização dos criadouros, vacinação, uso de drogas antimicrobianas, etc. Estes métodos têm, entretanto, demonstrado uma eficácia limitada, sendo muitas vezes ineficientes no controle de morbidade e mortalidade por APEC. Além disso, estudos recentes apontam para um aumento na resistência desses microorganismos às drogas antimicrobianas mais comumente utilizadas no combate aos diferentes tipos de infecção (Zhao, 2005).

Um dos fatores que contribuem para a ineficácia parcial dos métodos de prevenção e controle das colibaciloses, e para a prevalência relativamente alta da doença, é a possibilidade de transferência horizontal de material genético entre linhagens resistentes e não resistentes, ou entre linhagens patogênicas e não patogênicas, efetuada, principalmente, através da transferência plasmidial (Fantinatti *et al.*, 1994; Skyberg *et al.*, 2006; Nakazato *et al.*, 2007; Stehling *et al.*, 2007, 2008; Campos *et al.*, 2008a). Em um estudo recente, Skyberg *et al.* (2006) demonstraram que a aquisição de um plasmídeo patogênico (contendo vários genes associados à virulência) de APEC por uma linhagem comensal de *E. coli* aumentou a capacidade desta última de matar embriões de galinhas, colonizar o rim de camundongos e crescer em urina humana. Tal trabalho é importante, não apenas por evidenciar a possibilidade de aquisição de patogenicidade por linhagens comensais de aves, mas também por sugerir que plasmídios de linhagens APEC podem atuar como reservatórios de genes de virulência para humanos. Isto confere, ainda, maior importância para estudos relacionados às APECs, por ultrapassar a esfera econômica da indústria alimentícia, alcançando interesses significativos em saúde pública.

Por muitos anos, aceitou-se que as linhagens APEC são patógenos oportunistas (Dziva & Stevens, 2008). Estudos recentes, contudo, tem apontado diferenças claras na distribuição de fatores de virulência entre linhagens APEC e linhagens fecais de *E. coli* comensais de aves, denominadas AFEC – da sigla em inglês para “avian fecal commensal *E. coli*” (Johnson *et al.*, 2008; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Isso indica que linhagens APEC possuem uma maquinaria adaptada para a patogenicidade. (Johnson *et al.*, 2008; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Devido a natureza extraintestinal das doenças causadas por APEC, parece razoável aceitar que linhagens APEC são mais similares às linhagens humanas causadoras de doenças extra-intestinais, ExPEC (do inglês “Extra-intestinal Pathogenic *Escherichia coli*”). De fato, o primeiro genoma completo de APEC (Johnson *et al.*, 2007) revelou uma forte similaridade entre tal genoma e aqueles pré-estabelecidos para ExPEC humanas. O grupo de ExPEC humanas constitui-se de pelo menos dois patótipos – Patótipo é definido como um grupo de linhagens de uma espécie que causam uma doença comum empregando um conjunto comum de fatores de virulência (Kaper *et al.*, 2004) – sendo estes: *Escherichia coli* uropatogênica, UPEC (do inglês *Uropathogenic Escherichia coli*) e *Escherichia coli* associada a meningite/sepsis, NMEC (do inglês *Meningitis/sepsis-*

associatad Escherichia coli). Considerando-se que todas as linhagens APEC causam um conjunto comum de doenças em frangos, caso elas se utilizem de um conjunto comum de fatores de virulência, então devem constituir um patótipo, como sugerem alguns pesquisadores (Kaper *et al.*, 2004; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Dois problemas, porém, emergem dessa consideração: linhagens APEC podem causar diferentes doenças; e até o momento não foi descrito um conjunto de fatores de virulência associado com o fenótipo patogênico de APEC, capaz de explicar a manifestação de tal fenótipo, como ocorre para patótipos de linhagens humanas (Kaper *et al.*, 2004). Para ilustrar, o patótipo de *E. coli* humana enteropatogênica, EPEC (do inglês *Enteropathogenic Escherichia coli*) é definido pela presença da ilha de patogenicidade “locus for enterocyte effacement” (LEE), a qual contém os genes responsáveis pela formação da lesão “ataching and effacing” (AE); outro patótipo, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC, do inglês *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*) é definido pela presença da mesma ilha LEE e mais o gene codificador da toxina shiga (“*shiga-toxin*”), e causa a síndrome hemolítica urêmica, característica desta linhagem. De fato, a patogênese de APEC é pouco elucidada comparada com linhagens de *E. coli* patogênicas para humanos (Dziva & Stevens, 2008), de forma que é preciso revisar a definição do grupo APEC (Delicato *et al.*, 2003), uma vez que diferentes combinações de genes de virulência podem implicar diferentes mecanismos de virulência dentro do grupo, de forma que é possível que existam diferentes subpatótipos ou mesmo patótipos distintos dentro do grupo APEC (Delicato *et al.*, 2003).

1.2 Ilhas de Patogenicidade

O conteúdo e a organização da informação genética de uma espécie se alteram ao longo do tempo, sendo esse processo conhecido como evolução do genoma. Esse processo inclui algumas formas de mudanças genômicas: mutações pontuais, conversões gênicas, rearranjos, deleções e inserções de DNA externo, através da transferência horizontal de material genético (Schmidt & Hensel, 2004). Os mecanismos de fluxo gênico horizontal incluem elementos genéticos móveis, como plasmídios conjugativos, bacteriófagos, *transposons*, elementos de inserção e ilhas genômicas (Hacker & Carniel, 2001). Ilhas genômicas são regiões genômicas constituídas por elementos móveis. Dependendo da

função que codificam, ou da vantagem relativa que conferem aos organismos que as carregam no que diz respeito à sobrevivência em certos nichos, as ilhas genômicas podem ser, de fato, ilhas de patogenicidade, de simbiose, de “*fitness*”, metabólicas ou de resistência (Hacker & Carniel, 2001). Ilhas de Patogenicidade foram, recentemente, identificadas como elementos móveis que carregam grupos gênicos (“*gene clusters*”) associados à virulência (Hacker & Kaper, 2000).

As ilhas genômicas são mais comumente encontradas em bactérias que integram comunidades das quais outras espécies também fazem parte, o que lhes confere acesso a um reservatório (“*pool*”) genético horizontal, isto é, lhes confere oportunidade de trocas de material genético com espécies não necessariamente relacionadas. São exemplos dessas comunidades os biofilmes, a rizosfera e os tegumentos e trato digestivos de animais (Dobrindt *et al.*, 2004). A bactéria *Escherichia coli* é integrante regular da microbiota do trato gastrointestinal de muitos animais, incluindo mamíferos e aves; e possui capacidade de formar biofilme tanto em superfícies abióticas quanto bióticas (Sheikh *et al.*, 2001). Assim, *E. coli* constitui-se em uma excelente candidata para identificação e estudo de ilhas genômicas. De fato, muitas ilhas genômicas já foram identificadas e caracterizadas em algumas linhagens de *Escherichia coli* (Shen *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2007). Pelo menos quatro ilhas de patogenicidade já foram identificadas em UPEC (Lloyd *et al.*, 2007) e duas em APEC (Parreira & Gyles, 2003; Kariyawasam *et al.*, 2006a).

Em uma extensa revisão, Schmidt & Hensel (2004) apontaram as principais características das ilhas de patogenicidade: carregam um ou mais genes de virulência; estão presentes no genoma de bactérias patogênicas e ausentes do genoma de uma linhagem não patogênica da mesma espécie; ocupam regiões genômicas relativamente grandes, medindo de 10 a 200kb; geralmente diferem do restante do genoma no que diz respeito à composição de bases, expressa como a porcentagem de guanina e citosina em relação ao genoma, e ao “*codon usage*” sendo, freqüentemente, localizadas próximas a genes de RNAt. Essa observação levou a hipótese de que esses genes (RNAt) serviriam como pontos de ancoragem para a inserção de DNA heterólogo, adquirido através de transferência gênica horizontal. Essas regiões são, freqüentemente, flanqueadas por repetições diretas (DR), as quais podem ter servido como sítios de reconhecimento para a integração de bacteriófagos e a integração destes teria resultado em duplicação da DR. Além disso, DRs atuam como

seqüências de reconhecimento para enzimas envolvidas na excisão de elementos genéticos móveis, contribuindo, portanto, para a instabilidade da PAI; e, geralmente, carregam genes, funcionais ou crípticos, relacionados à mobilidade, como integrases e transposases; podendo, ainda, conter seqüências de inserção (IS), as quais, quando combinadas em um par, podem contribuir para a mobilidade de porções grandes de DNA. Assim, PAIs podem representar plasmídios integrados, transposons conjugativos, bacteriófagos, ou partes desses elementos (Hacker *et al.*, 1997); são freqüentemente instáveis e deletadas com freqüências próprias, distintas. Propriedades de virulência codificadas por certas PAIs são perdidas com uma freqüência superior à taxa normal de mutação. Análises genéticas demonstraram que tais alterações na virulência não são causadas por defeitos em genes individuais contidos no interior da PAI, mas por perda de grande porções dessa ou até mesmo pela perda de toda a ilha de patogenicidade. Isso indica que algumas PAIs, em particular, possuem uma instabilidade genética intrínseca, sendo a taxa de deleção característica de cada PAI (Middendorf *et al.*, 2004). Os mesmos mecanismos genéticos que permitem a distribuição de PAIs por transferência genética horizontal também determinam sua instabilidade; freqüentemente representam estruturas semelhantes a mosaico, com uma estrutura complexa, já que elementos de diferentes origem estão presentes e, mais raramente, representam segmentos homogêneos de DNA horizontalmente adquiridos, por inserção de um segmento genético único.

Embora essas características sejam tradicionalmente apresentadas como propriedades de PAIs, o crescente acúmulo de informações sobre o tema dificulta o estabelecimento de definições claras. Assim, a divisão de ilhas genômicas em diferentes subtipos não é apenas baseada na composição gênica da ilha, mas também, e principalmente, no efeito da presença da ilha sobre um organismo particular em um nicho ecológico específico. Isso significa que uma mesma ilha pode desempenhar diferentes funções. Por exemplo, uma ilha genômica que atua como ilha de “*fitness*”, permitindo à bactéria melhor explorar elementos de seu nicho, pode, também, contribuir para a patogenicidade da bactéria quando ela se encontra no interior de um hospedeiro. Os genes que codificam sistemas de aquisição de ferro, que podem estar presentes em ilhas genômicas, ilustram essa questão. Esses sistemas de aquisição de ferro têm grande importância para as bactérias em ambientes com baixa concentração do metal. Mas o

mesmo sistema pode contribuir para a sobrevivência da bactéria e sua patogenicidade quando essa penetra em um hospedeiro.

Essa “dupla função” é válida, também, para ilhas de patogenicidade que contêm genes responsáveis pela produção de adesinas (Hacker & Carniel, 2001). Genes presentes no interior de PAIs, relacionados à patogenicidade, podem estar associados também à formação de biofilme e à persistência bacteriana no ambiente (Cucarella *et al.*, 2001; Úbeda *et al.*, 2003). A perda de ilhas de patogenicidade pode ocorrer devido à indução do sistema SOS de reparo de DNA pelos antibióticos do grupo das fluoroquinolonas (Úbeda *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2006).

1.3. Biofilme e “*Quorum sensing*”

Muitos microrganismos possuem a capacidade de se aderirem, formando biofilmes. Biofilmes são camadas múltiplas de bactérias em associação (sendo que pode haver ainda associação com outros microrganismos), que se formam em diferentes tipos de superfície, tipicamente, envoltas por uma matriz extracelular. Biofilmes são, também, comunidades bacterianas aderidas a superfícies vivas (Costerton *et al.*, 1987; Costerton *et al.*, 1994). Entretanto, a definição de biofilme tem evoluído ao longo das três últimas décadas e uma definição mais recente de biofilme, a de Donlan & Costerton (2002), contempla atributos fisiológicos peculiares que são adquiridos por organismos que formam biofilme. Segundo essa definição, biofilme é uma comunidade sésil de microrganismos caracterizada por células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, ou interface, ou umas as outras, e que produzem uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, na qual ficam embebidas, apresentando fenótipo alterado em relação à resistência, taxa de crescimento e transcrição gênica. O desenvolvimento do biofilme é um processo multifatorial, onde as bactérias livres, denominadas planctônicas, estão dispersas no meio e através de sua capacidade de motilidade, começam a se agrupar, através de estruturas que conferem adesividade a esses organismos, tais como adesinas fimbriais ou proteínas de membrana externa, tornando-se imobilizadas na superfície. Inicia-se a formação de microcolônias, geralmente facilitada pela presença de flagelos e, em seguida, a bactéria move-se ao longo da superfície e associa-se a outras. Finalmente, uma estrutura tridimensional é formada,

com a participação de polissacarídeos extracelulares e do lipopolissacarídeo da parede. Esta estrutura é composta por pilares de bactéria embebidos em canais de água que permitem a entrada de nutrientes e excreção de metabólitos para o meio (Costerton *et al.*, 1995; Watnick & Kolter, 1999). Os biofilmes, além de representarem mecanismos de colonização, conferem resistência à ação de alguns antimicrobianos (Stewart & Costerton, 2001).

Outra vantagem oferecida pela estrutura do biofilme às bactérias que o compõem, devido à proximidade entre as mesmas, é a habilidade de adquirir elementos genéticos móveis, transmissíveis, como plasmídios e ilhas de patogenicidade, a taxas elevadas. Essa propriedade é de particular interesse para a indústria avícola dado que, em APECs, a virulência e a resistência a antimicrobicidas podem ser mediadas por plasmídios conjugativos (Fantinatti *et al.*, 1994; Dozois *et al.*, 2000; Ginns *et al.*, 2000; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005) e ilhas de patogenicidade (Kariyawasam *et al.*, 2006a; Kariyawasam *et al.*, 2006b). Muitos autores afirmam que *Escherichia coli* de origem aviária pode ser transmitida a seres humanos, podendo causar infecção extra-intestinal, ou atuar como fonte de genes de virulência e resistência para bactérias patogênicas humanas (Levy *et al.*, 1976; Caudry & Stanisich 1979; Skyberg *et al.*, 2006). Portanto, a formação de biofilme pode favorecer a transferência gênica horizontal (Dobrindt *et al.*, 2004), aumentando a patogenicidade e a resistência de APEC e causando problemas para a saúde pública e animal.

Além disso, bactérias residentes de biofilmes possuem maior resistência à limpeza e processos de sanitização (Davey & O'Toole, 2000). Essa peculiaridade é de grande importância para a produção e processamento de aves, onde são empregadas superfícies plásticas, nas quais há desenvolvimento de biofilme. No ambiente de produção de aves, são empregados extensos sistemas de distribuição de água constituídos por plásticos, os quais podem contribuir para a transmissão de muitos patógenos de aves, incluindo *E. coli* (do Amaral, 2004). Estruturas de plástico, material que permite adesão bacteriana e formação de biofilme, também são usados na indústria alimentícia para a construção de tanques e condutos. Estudos que contribuam para a melhor compreensão da formação de biofilme por linhagens APEC são, portanto, de extrema importância. Contudo, há apenas um estudo

(Skyberg *et al.*, 2007) que investiga a formação de biofilmes em um grande número de amostras de *E. coli* aviárias, o que evidencia a carência de trabalhos na área.

O fenômeno de “*quorum sensing*” poder estar associado à formação de biofilme. Esse fenômeno consiste na coordenação da expressão gênica em resposta à densidade da população celular através da comunicação entre as células por meio de moléculas sintetizadas e secretadas pelas próprias células bacterianas (Fuqua *et al.*, 1994). “*Quorum sensing*” foi, inicialmente, descrito em *Vibrio fischeri* na regulação da bioluminescência (Nealson *et al.*, 1970). Apesar desse fenômeno também estar presente em *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 1991), sua participação na formação de biofilme em linhagens aviárias (APEC) não foi estabelecida.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária representantes de 4 grupos, sendo um grupo de linhagens comensais (AFEC) e três grupos de linhagens patogênicas, causadoras de três síndromes diferentes em seu hospedeiro (septicemia, síndrome da cabeça inchada e onfalite), a fim de compreender a relação entre as diferentes linhagens.

A partir disto, procurou-se inferir a estrutura populacional do grupo. Para tanto, nesse estudo, investigamos a possibilidade de APEC não constituir um grupo homogêneo, sendo constituído por diferentes subgrupos internos (ou possíveis patótipos), estruturados de acordo com as doenças causadas pelas linhagens. Assim, para verificar se as linhagens causadoras de uma doença específica constituem um grupo diferente daquele constituído por linhagens causadoras de outra doença, estudamos linhagens AFEC e linhagens APEC associadas com as diferentes condições patológicas – septicemia, onfalite e síndrome da cabeça inchada – com o intuito de verificar se há diferenças, fenotípicas e genotípicas, entre estes grupos.

Para a caracterização das linhagens de *E. coli* aviárias, as características biológicas estudadas foram: adesão em células eucarióticas, formação de biofilme, produção de molécula sinalizadora de *quorum sensing*, presença de genes de Ilhas de Patogenicidade, dose de patogenicidade (LD_{50}), grupo filogenético e presença de genes de virulência

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens Bacterianas

Neste estudo foram utilizadas 49 linhagens de *Escherichia coli* isoladas de frangos comerciais adultos de diferentes regiões do Brasil, apresentando sinais clínicos de doenças. Destas, 24 linhagens (S1-S24) foram isoladas do fígado, sacos aéreos e pulmões de aves com sinais clínicos de septicemia (S); 14 linhagens (SHS1-SHS4; SHS6-SHS15) foram isoladas do tecido infra-orbital de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada (SHS); e 11 linhagens (O1-O11) foram isoladas do saco da gema de aves com 1 dia de idade apresentando sinais clínicos de onfalite (O). Adicionalmente, foram utilizadas 30 linhagens isoladas da cloaca de aves sem sinais clínicos de doenças infecciosas causadas por *E. coli* (N; N1-N30), denominadas comensais ou *Escherichia coli* de fezes de aves, AFEC (da sigla em inglês para “*Avian Fecal Escherichia coli*”). Todas as linhagens pertencem ao Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas (DMI, Unicamp). Todas as linhagens bacterianas empregadas neste estudo foram preservadas a - 80°C em meio LB com adição da solução de “Hogness” (50% concentração final).

As linhagens bacterianas utilizadas como padrões para os testes foram:

Amostra O42: A amostra protótipo de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042-sorotipo O44:H18 (Nataro & Kaper, 1998) foi empregada como referencial para alta capacidade de formação de biofilme nos ensaios de formação de biofilme, em testes com cristal violeta para verificar adesão a placas de poliestireno.

Amostra DH5 α : A amostra DH5 α (Bethesda Research Laboratories, 1986), é uma amostra comercial derivada da amostra DH5 descrita por Hanahan (1985). Foi empregada como referencial para baixa capacidade de formação de biofilme nos ensaios de formação de biofilme, em testes com cristal violeta para verificar adesão a placas de poliestireno.

Amostra E23: A amostra TEVS 232 (Sperandio *et al.* 1999), denominada neste trabalho como E23, foi utilizada como amostra repórter para a atividade da enzima β -galactosidase. Esta amostra contém a fusão LEE1 : : lacZ. Na presença de molécula auto-

indutora de *quorum sensing*, o operon LEE é ativado e então a enzima β -galactosidase é produzida. Esta amostra foi utilizada nos ensaios de *quorum sensing*.

3.2. Soluções, meios de cultura e condições de cultivo

3.2.1. *Meio Luria Bertani (LB) (Miller, 1972).*

Triptona – 10,00g

NaCl – 10,00g

Extrato de levedura – 5,00g

Água deionizada q.s.p. – 1000,00ml

Após o preparo, o meio de cultura foi aquecido em autoclave a 121,6°C durante 20 minutos, para esterilização.

3.2.2. *Solução de Hogness (Sambrook et al., 1989)*

K_2HPO_4 – 6,30g

$Na_3C_6H_5O_2 \cdot 2H_2O$ – 0,45g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,09g

$(NH_4)SO_4$ – 0,90g

KH_2PO_4 – 1,80g

Glicerol – 44,00ml

Água deionizada q.s.p. – 100ml

Após o preparo, a solução foi esterilizada sob vapor fluente, durante 40 minutos. 500 μ l de solução Hogness foram adicionados a 500 μ l da suspensão de cada linhagem bacteriana, previamente cultivada em LB (37°C por 18 horas), para a realização de estoques, que foram mantidos a -80°C.

3.2.3. Solução de EDTA 0,5M pH 8,0 (Sambrook et al., 1989)

86,10g de EDTA dihidratado foram misturados em 800mL de água deionizada. Sob agitação vigorosa, o pH foi ajustado para 8,0 com a adição de uma solução de 10N de NaOH. Após o ajuste do pH, água deionizada foi adicionada à solução até que essa atingisse o volume final de 1000mL. A solução foi distribuída em alíquotas de 20mL e autoclavada a 121,6°C, durante 20 minutos. Após resfriamento, as alíquotas foram mantidas a -20°C

3.2.4. Tampão Tris-Borato-EDTA 5X (TEB) (Sambrook et al., 1989)

Tris-base – 54,0g

Ácido bórico – 27,50g

EDTA 0,5M pH 8,0 – 20,00 ml

Água deionizada q.s.p. – 1000ml

Após o preparo, o tampão foi mantido à temperatura de 4°C. Para a realização de gel de agarose e eletroforese, o tampão TEB foi utilizado à concentração de 1X.

3.2.5. Gel de agarose (Sambrook et al., 1989)

Para o preparo do gel de eletroforese, a agarose foi dissolvida em tampão TEB 1X, em forno de microondas, resfriada e colocada em cuba de eletroforese horizontal. Os géis utilizados nesse estudo apresentaram concentração de 0,8% a 1,5% de agarose.

3.2.6. Solução de brometo de etideo (0,5µg/mL) (Sambrook et al., 1989)

Solução de brometo de etideo 1% 0,05mL

Água deionizada q.s.p. 100,00mL

Após o preparo, a solução foi armazenada a 4°C em ambiente isento escuro, até o momento do uso.

3.2.7. Condições de cultivo

Meio ágar MacConkey foi utilizado para o isolamento primário. Para testes de rotina, foram empregados os meios LB e LA (Sambrook *et al.*, 1989). Todos os cultivos foram realizados a 37°C.

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para determinação dos grupos filogenéticos, para detecção dos genes de virulência, e para detecção dos genes associados a ilhas de patogenicidade, conforme descrito nos itens 3.6, 3.7 e 3.8, respectivamente.

A reação foi realizada em microtubos, em um volume final de 50µl, contendo uma suspensão de 20ng de DNA extraído conforme descrito no item “extração de DNA”, 20pmol de cada iniciador do gene específico (tabela 1), 10mM de DNTPs (Invitrogen), 5µL do tampão de reação 5x concentrado (Invitrogen) e duas unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para completar 50µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador. Para cada reação foram realizados 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo em 1min à temperatura de 94°C, 1 min. à temperatura de anelamento específica para cada par de iniciadores (conforme consta na tabela 1) e 2 min. a 72°C.

Uma alíquota de 5µL do produto das reações foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, com tampão TEB. Após a eletroforese, o gel foi impregnado com solução de

brometo de etídeo e visualizado em transluminador com luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

3.5. Iniciadores

Os iniciadores utilizados na determinação dos grupos filogenéticos (A, B1, B2, D), detecção de genes de virulência e detecção de genes associados a ilhas de patogenicidade, bem como suas respectivas temperaturas de anelamento e referências de onde suas seqüências foram retiradas estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR, com suas respectivas descrições, temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos amplificados e referências de onde as seqüências foram extraídas.

| Gene | Descrição | Anelamento (°C) | Fragmento (bp) | Referência |
|-----------------|--|-----------------|----------------|------------------------------------|
| <i>chuA</i> | Proteína de transporte heme | 55 | 279 | Clermont <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>yja</i> | Gene de função desconhecida | 55 | 211 | Clermont <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>TspE4.C2</i> | Fragmento anônimo de DNA | 55 | 152 | Clermont <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>iucA</i> | Aerobactina sintetase | 55 | 1100 | Okeke <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>irp-2</i> | Gene "ferro reprimido" associado a yersiniabactina | 59 | 287 | Schubert <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>fep C</i> | Enterobactina de transporte de ferro ATP-ligada | 55 | 347 | Ye & Xu, 2001 |
| <i>sitA</i> | Transporte de ferro | 59 | 608 | Runyen-Janeck <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>fyuA</i> | Yersiniabactina | 63 | 787 | Schubert <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>fimA</i> | Subunidade estrutural da fimbria tipo 1 | 50 | 331 | Marc & Dho-Moulin, 1996 |
| <i>papA</i> | Proteína estrutural da fimbria P | 65 | 328 | Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>crl</i> | Gene regulatório da fimbria "curli" | 54 | 250 | Maurer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>csgA</i> | Proteína estrutural da fimbria "curli" | 55 | 200 | Maurer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>tsh</i> | Hemaglutinina termo-sensível | 61 | 420 | Maurer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>lpfA0141</i> | Fimbria LPF | 55 | 412 | Szalo <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>lpfA0154</i> | Fimbria LPF | 55 | 525 | Toma <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>iha</i> | Proteína de adesão | 55 | 602 | Schmidt <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>fyu</i> | Yersiniabactina (PAI IV UPEC-536) | 61 | 880 | Soto <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>ireA</i> | Elemento responsivo a ferro (PAI IAPEC-01) | 57 | 1162 | Kariyawasam <i>et al.</i> , 2006a |
| <i>tia</i> | Proteína de membrana externa – adesão/invasão (PAI IAPEC-01) | 58 | 507 | Kariyawasam <i>et al.</i> , 2006a |
| <i>papA</i> | Proteína estrutural da fimbria P (PAI IAPEC-01) | 60 | 720 | Kariyawasam <i>et al.</i> , 2006a |
| <i>papG II</i> | Proteína estrutural da fimbria P (PAI IAPEC-01) | 61 | 190 | Kariyawasam <i>et al.</i> , 2006a |
| PAI | Fragmento de DNA (PAI IAPEC-01) | 60 | 930 | Kariyawasam <i>et al.</i> , 2006a |

3.6. Grupos Filogenéticos

Os grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) de *E. coli* foram determinados utilizando-se a técnica de “multiplex” PCR descrita por Clermont *et al.* (2000). Essa técnica baseia-se na detecção e combinação de três genes – *chuA* (gene de transporte heme), *yja* (gene de função desconhecida de *E. coli* K12) e *Tsp.E4C2* (fragmento de DNA de *E. coli* enterohemorrágica, EHEC) – para determinar a qual grupo filogenético a amostra pertence. Assim, de acordo com os genes detectados em dada amostra, ela será considerada pertencente ao grupo filogenético: A, quando $chuA^-/Tsp.E4C2^-$; B1, quando $chuA^-/Tsp.E4C2^+$; B2, quando $chuA^+/yja^+$; e D, quando $chuA^+/yja^-$. A figura 1 ilustra a árvore de decisão. A “multiplex” PCR foi realizada adicionando-se os 3 pares de iniciadores (um par para cada um dos três genes, *chuA*, *yja* e *Tsp.E4C2*) ao mesmo tubo de reação. As condições da reação, bem como a visualização do produto, estão descritas no item “PCR”.

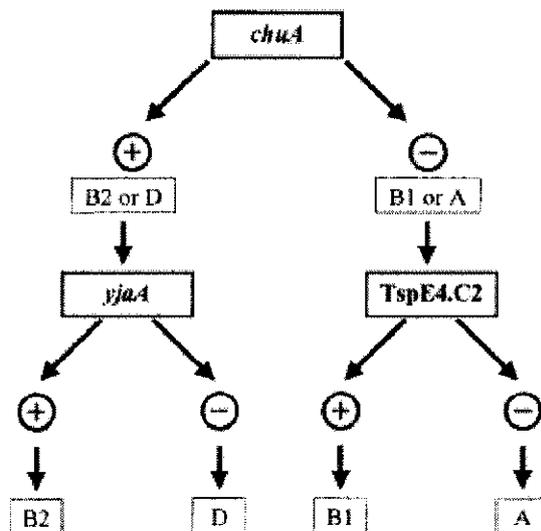


Fig 1. Árvore de decisão dicotomizada para determinação do grupo filogenético de linhagens *E. coli* com base no resultado da amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yja* e do fragmento de DNA *Tsp.E4C2*. Extraído de Clermont *et al.* 2000.

3.7. Genes de Virulência

Genes associados à virulência de APEC (e de *E. coli* patogênicas para humanos, além de *Salmonella sp.* e *Yersinia enterocolitica*) foram detectados a partir da reação em cadeia de PCR. Para isso, foi realizada a detecção de genes associados à expressão das seguintes estruturas que conferem capacidade de adesão e colonização de linhagens APEC: fimbrias tipo 1 (*fimA*), P (*papA*) e “curli” (*crl*, *csgA*); de genes associados à adesão de linhagens STEC (*Shiga-tonxin E. coli*): *IpfA*_{O157:O141}, *IpfA*_{O147:O154}, *iha*. Complementarmente, foram detectados genes de captação de ferro de *E. coli* (*iucA*, *fepC*), *Salmonella* entérica (*sitA*), e de *Y. enterocolitica* (*fyuA*, *irp-2*). As informações sobre os iniciadores estão na tabela 1. A reação e a identificação de seu produto foram realizadas conforme descrito no item 3.4.

3.8. Ilhas de Patogenicidade

A presença de ilhas de patogenicidade para todas as amostras foi verificada indiretamente, através de PCR de genes descritos no interior destas ilhas. Foram verificadas uma ilha de APEC, denominada PAI_{IAPEC-01} (Kariyawasam *et al.*, 2006a), através dos genes *tia*, *ireA*, *papA*, *papG* e do fragmento PAI presente nessa ilha; e uma ilha de UPEC, denominada PAI_{IV UPEC-536} através do gene *fyuA* (Soto *et al.*, 2006). Os iniciadores utilizados estão relacionados na tabela 1. As condições da reação, bem como a identificação do produto estão descritas no item 3.4.

3.9. Teste de Patogenicidade: Dose Letal 50% (LD₅₀)

Os valores de dose letal 50% das linhagens APEC e AFEC analisados nesse estudo foram determinados em ensaios previamente realizados por Silveira *et al.* (2002a), conforme metodologia descrita por Silveira *et al.* (1994). Resumidamente, volumes de 0,5 mL de diluições 1/10 das linhagens, previamente cultivadas em LB a 37°C sob agitação por 4 horas, foram injetadas subcutaneamente na região do pescoço de pintos com um dia de idade. Os pintos foram organizados em grupos com 6 indivíduos. Simultaneamente, as

diluições foram cultivadas em meio LA para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFCs). Os grupos controles e os grupos infectados foram observados durante 7 dias e as DL50 foram calculadas como descrito por Reed & Muech (1938).

3.10. Ensaio de formação de biofilme

Para verificar a capacidade de formação de biofilme foi realizado o teste colorimétrico de cristal violeta em placas de poliestireno, com período de 24 horas de incubação, conforme descrito por Skyberg *et al.* (2007), com modificações. O teste consiste na quantificação indireta da massa de células irreversivelmente aderida à superfície abiótica após o período de incubação.

As amostras APEC foram incubadas por 16 horas em meio LB; uma alíquota de 10 µL de cada inóculo bacteriano foi adicionada a uma cavidade de uma placa de poliestireno de 24 cavidades, cada qual contendo 1000 µL de meio LB, de forma que o caldo bacteriano sofreu uma diluição de 1:100. O teste foi realizado em triplicata para cada uma das amostras. As placas foram incubadas por 24 horas sem agitação a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas 4 vezes com PBS pH 7,2, a fim de retirar as células bacterianas não aderidas à superfície de poliestireno. As células bacterianas foram, então, fixadas com etanol 75% por 10 minutos; após secagem do fixador em contato com o ar por aproximadamente 60 min., as bactérias foram coradas com solução de cristal violeta 1,0% por 5 minutos. O excesso de corante foi retirado por três lavagens sucessivas das placas com água esterilizada. A seguir, adicionaram-se 200 µL de etanol 95% em cada cavidade, deixando-o solubilizar o corante por 2 minutos à temperatura ambiente. Um volume de 150 µL da eluição foi transferido para uma placa de microtitulação de 96 cavidades e a densidade óptica medida a 595nm. Como controle positivo, foi utilizada uma linhagem de *E. coli* humana entero-agravativa com alta capacidade de formação de biofilme (amostra O42), e como controle negativo foi utilizada a linhagem DH5α, com baixa capacidade de formação de biofilme. Ambas as amostras-controle foram também testadas em triplicata, em cada placa.

3.11. Produção de molécula auto-indutora de *Quorum sensing*

As amostras APEC foram incubadas por 16 horas em meio LB a 37°C, sem agitação. As células bacterianas foram precipitadas por centrifugação a 10000 rpm por dois minutos e uma alíquota de 5 mL do meio livre de células foi retirada. Este meio foi denominado pré-condicionado, por conter moléculas sintetizadas pelas células bacterianas (dentre as quais, possíveis moléculas auto-indutoras de *quorum sensing*). Uma alíquota de 50 µL da amostra repórter TEVS232 (E23) contendo a fusão LEE1 : : *lacZ* (Sperandio *et al.* 1999), foi, então, inoculada em 5 mL de cada um dos meios pré-condicionados e a suspensão incubada a 37°C, com agitação de 250 rpm até a atingir DO₆₀₀ < 0,2.

Os caldos contendo a amostra repórter foram mantidos em gelo por 20 minutos e, em seguida, 100 µL deste caldo foi transferido para um tubo contendo 900 µL de tampão Z (Na₂HPO₄ · 7H₂O 0,06M / NaH₂PO₄ · H₂O 0,04M / KCl 0,01M / MgSO₄ · 7H₂O 0,001M / β mercaptoetanol 0,05M pH 7,0). Para ruptura das células foi, então, adicionada uma gota de SDS 10% e duas gotas de clorofórmio. Após a homogeneização e ruptura celular (aproximadamente 5 minutos), adicionou-se uma solução contendo 200 µL de ONPG (Orto-Nitro-Fenil-β-galactopronosideo) 4mg/mL e tampão fosfato 0,1 M, mantendo-se os tubos à temperatura ambiente. A reação foi monitorada até o aparecimento da coloração amarela, oriunda do produto da atividade da enzima β-galactosidase sobre o substrato ONPG. A reação foi interrompida com adição de 500 µL de Na₂CO₃ 1M. A seguir, 1 mL da solução foi, então, transferida para microtubos, e os mesmos centrifugados por 5 minutos, a 12000rpm, a 4°C e a DO₄₂₀ foi verificada. A Atividade da enzima β – betagalactosidase foi determinada por unidades de Miller (Miller, 1972), calculadas pela fórmula:

Miller Units = (1000 x OD₄₂₀)/(TxVxOD₆₀₀), onde:

T = tempo de reação em minutos;

V = volume inicial da cultura (100 µL para todos os ensaios realizados)

Por se tratar de um teste dispendioso e por ter como objetivo apenas verificar a presença de molécula auto-indutora em amostras APEC, este teste não foi realizado com toda a coleção de amostras, mas apenas com quatro amostras septicêmicas (S2, S7, S362 e S389), duas amostras de síndrome da cabeça inchada (SCI3 e SCI9), duas amostras de onfalite (O1 e O8) e duas amostras comensais, AFEC (N3 e N10). Como controle positivo,

foi utilizada a amostra E23 (identificada por E2348(2)) e como controle negativo, a amostra DH5 α . Complementarmente, como controle negativo, foi utilizada uma alíquota de meio LB não pré-condicionado por crescimento bacteriano.

3.12. Teste de adesão em células HeLa e Hep-2

O teste de adesão foi realizado segundo a metodologia descrita por Scaletsky *et al.* (1984), com algumas alterações. As amostras bacterianas foram testadas em presença e ausência de D-manose, em células HeLa (carcinoma de útero humano) e Hep-2 (carcinoma de laringe humana). As moléculas de manose ocupam os sítios de ligação da fimbria tipo 1, saturando-os. Portanto, o teste de adesão na presença de manose tem por objetivo verificar se há uma fimbria não tipo 1 envolvida na adesão. Células HeLa e HEp-2 foram descongeladas em banho de água a 37°C e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM/Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB/Cultilab) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (1000 U/mL; Sigma) e estreptomicina (250 μ g/mL; Sigma). Os frascos de cultura foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas até a formação da monocamada celular. Após este período o meio de cultura foi descartado sendo adicionado à cultura celular uma solução de AVT (Associação Tripsina Versene/Cultilab) para descolamento da monocamada. As células foram ressuspensas no meio MEM acrescido de 10% de SFB e 1 % de antibióticos, para um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/mL. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 24 cavidades, em volume de 1mL por cavidade. As microplacas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até formação de monocamadas celulares.

Cada linhagem bacteriana testada foi incubada por 16 horas em meio LB. Em seguida, 100 μ L desse caldo bacteriano foram transferidos a um orifício da placa plástica de 24 poços, contendo a monocamada de células HeLa, ou Hep-2, sobre lamínulas de vidro previamente preparados. Além do caldo, foram acrescentados 1mL de meio D-MEM novo e 0,5 mL de soro fetal bovino. Para os testes com D-manose, a metodologia foi a mesma, com a diferença de que se adicionou, nessa etapa, 0,1 mL de manose 10%. As placas foram incubadas a 37°C por 30 min, para que houvesse adesão bacteriana às células eucarióticas.

Após tal período, o meio foi descartado e as placas lavadas 3 vezes com PBS. Foi acrescentado 1 mL de meio D-MEM novamente, além das mesmas quantidades dos demais produtos. Nova incubação a 37°C foi realizada, dessa vez por 3 horas. Após tal período, foram realizadas 6 lavagens com PBS para cada placa, seguidas de fixação com metanol e coloração com May-Grünwald e Giemsa. A visualização foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de imersão.

3.13. Teste de Adesão em Células Epiteliais de Traquéia

A adesão a células epiteliais de traquéia foi determinada conforme descrito por Dhomoulin e Lafont (1982).

3.14. Análise Estatística

Vários testes estatísticos foram realizadas com o objetivo de estudar a estrutura populacional das diferentes linhagens sob análise.

Assim, os dados foram inicialmente organizados em uma matriz binária indicando a presença ou ausência dos traços testados, genotípicos e fenotípicos, considerados como 24 variáveis: 13 genes associados à patogenicidade (*fimA*, *papA*, *crl*, *csgA*, *tsh*, *lpfA0141*, *lpfA0154*, *iha*, *fyuA*, *irp-2*, *iucA*, *fepC*, *sitA*); e 11 categorias associadas a características fenotípicas relacionadas com patogenicidade – capacidade de adesão à traquéia na presença de manose (Traq CM), capacidade de adesão à traquéia na ausência de manose (Traq SM), capacidade de adesão a células HeLa na presença de manose (HeLaCM), capacidade de adesão a células HeLa na ausência de manose (HeLaSM), capacidade de adesão a células Hep-2 na presença de manose (Hep-2CM), capacidade de adesão a células Hep-2 na ausência de manose (Hep-2SM), grupo filogenético (levando-se em conta que estes grupos são determinados por presença ou ausência de genes específicos detectados através de PCR e uma vez que optou-se por uma abordagem fenotípica neste caso, os grupos B2 e D foram considerados uma única categoria, denominada B2+D, uma vez que concentram a maior parte das linhagens extra-intestinais patogênicas pertencem a um destes grupos; e os grupos A e B1 foram considerados outra categoria, denominada A+B1, uma vez que concentram a

maioria das linhagens extra-intestinais não patogênicas), dose letal (três categorias: $DL_{50} > 10^{10}$, $10^9 > DL_{50} < 10^7$ e $10^6 > DL_{50} < 10^5$). Os testes estatísticos realizados estão descritos abaixo.

3.14.1. Análise de Correspondência (CA)

Com os dados da Matriz Binária foi construída uma tabela de frequências para uso na Análise de Correspondência (CA) a fim de determinar a relação entre as amostras, isto é, para visualizar a estrutura da população de amostras, caso existisse alguma. A CA foi realizada com a tabela de frequências para presença ou ausência dos genes e traços fenotípicos dentro de cada grupo: N, S, H, O.

3.14.2. Teste G

As frequências destes traços foram comparadas entre os quatro grupos utilizando-se o teste G (Sokal & Rohlf, 1994), a fim de verificar se há diferença estatística na distribuição das características entre os grupos.

3.14.3. Análise de Componente Principal (PCA)

Outro teste, o modelo de Análise de Componente Principal foi construído utilizando-se as 24 variáveis para determinar a melhor separação entre os grupos. Este modelo foi construído duas vezes, a primeira incluindo todos os isolados (N, S, H e O) e a segunda, retirando-se os isolados S. As razões para isso estão explicadas em “resultados”, no item 4.9.5.

3.14.4. Algoritmo “K-means”

O algoritmo “K-means” foi utilizado, em uma análise separada, para verificar o agrupamento das 79 linhagens de acordo com os 24 traços analisados. O algoritmo não indica o número de grupos que otimiza a distribuição, sendo necessário indicar quantos

grupos se deseja formar. O algoritmo foi realizado para 2, 3 e 4 grupos, já que trabalhamos com 4 grupos de linhagens classificadas quanto à doença da qual foram isoladas, logo não faria sentido tentar formar mais grupos do que isso; e se trabalhássemos com apenas um grupo, o algoritmo alocaria todas as linhagens nesse único grupo.

3.14.5. Análise de Função Discriminante (DA)

Uma Análise de Função Discriminante (DA) foi realizada, utilizando todas as variáveis, para verificar quais variáveis são discriminantes entre os grupos N, S, H e O; entre os grupos 1, 2 e 3 obtidos pelo algoritmo “K-means”; entre os três níveis de patogenicidade (baixo, intermediário e alto) obtidos pelos experimentos de LD₅₀ (neste caso, essas três variáveis – $DL_{50} > 10^{10}$; $10^9 > DL_{50} < 10^7$; e $10^6 > DL_{50} < 10^5$ – não foram incluídas na construção do modelo); e entre o grupo formado por todas as linhagens APEC e as linhagens AFEC. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* STATISCA 6.0 (Statsoft).

3.15. Rede Complexa

Há muitos métodos para identificação de grupos, como agrupamento hierárquico ou análise de componente principal. Entretanto, uma abordagem baseada em rede acoplada a um algoritmo de identificação de módulo fornece uma única solução com limites bem definidos separando módulos (Guimerà et al. 2007). Nesta rede há dois conjuntos de nódulos (representados por formas geométricas), um conjunto representando cada traço analisado e outro conjunto representando as linhagens. Uma ligação (representada por traço) entre elementos destes dois tipos de nódulos indica a ocorrência de um dado traço em uma dada linhagem.

Foi utilizado um algoritmo identificador de módulo que consiste em encontrar partição da rede em grupos os quais maximizam a função de modularidade (Girvan and Newman, 2002). Esta função indica a diferença entre a fração de ligações dentro de cada módulo e a fração de ligações esperadas dentro de cada módulo por acaso (Guimerà *et al.* 2007). O algoritmo utiliza o método de simulação de anelamento (SA), uma técnica de

otimização estocástica que indica o menor número de partições a portanto a configuração ótima (Guimerà and Amaral 2005). A SA também permite verificar a significância do grau de modularidade por compará-lo com aquele de redes aleatórias de tamanho similar. Assim, realizamos a análise SA de 100 redes aleatórias para examinar se a rede empírica era mais modular que as aleatórias.

4. Resultados

4.1. Grupos Filogenéticos

A determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* por PCR indicou que 62% das linhagens foram classificadas como pertencentes ao grupo filogenético A, enquanto 21% foram classificadas no grupo D, 7,6% no B1 e 3,8% no B2.

Considerando-se apenas as linhagens consideradas patogênicas, 50% foram classificadas como pertencentes ao grupo A, 43% ao D, 4% ao B1 e 4% ao B2. Dentre as comensais, 83% das linhagens foram classificadas como pertencentes ao grupo A, 13% ao B1 e 3% ao B2. Nenhuma das linhagens comensais foi classificada como pertencente ao grupo D. Na tabela 2 estão expostos os resultados para cada grupo específico dentro das linhagens patogênicas (septicemia, síndrome da cabeça inchada e onfalite), além dos resultados para o grupo das comensais, ou AFEC (N).

Tabela 2. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária alocadas dentro de cada grupo filogenético (A, D, B1 e B2). N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais, ou AFECta; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Grupos Filogenéticos (%) | | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| Grupos | A | D | B1 | B2 |
| N | 25 (83,3) | 0 (0) | 4 (13,3) | 1 (3,3) |
| S | 11 (45,8) | 11 (45,8) | 2 (8,3) | 0 (0) |
| H | 3 (21,4) | 9 (64,3) | 0 (0) | 2 (14,3) |
| O | 8 (72,7) | 2 (18,2) | 1 (9,1) | 0 (0) |

Como exposto no item 3.14, para as análises estatísticas, as 4 categorias (A, B1, B2 e D) foram reduzidas a apenas duas: P, que inclui os grupos B2 e D, e NP, que inclui os grupos A e B1. O objetivo dessa reorganização dos dados é considerar as variáveis como características fenotípicas relacionadas à patogenicidade; e não a combinação dos três genes (item 3.6) que determinam o grupo ao qual dada linhagem pertence. Os resultados apresentados na forma de duas categorias estão expostos na tabela 3.

Dentre as amostras comensais, 29 (97%) foram classificadas como não patogênicas e apenas uma como patogênica. Dentre as patogênicas, 24 (49%) foram classificadas como patogênicas e 25 (51%) como não patogênicas. Entretanto, esses valores variam dentro de cada grupo, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária alocadas dentro do grupo considerado patogênico (B2+D) e do grupo considerado não patogênico (A+B1). N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Grupo | Grupo Filogenético (%) | |
|-------|------------------------|-------------|
| | P (B2 + D) | NP (A + B1) |
| N | 1 (3,3) | 29 (96,7) |
| S | 11 (45,8) | 13 (54,2) |
| H | 11 (78,6) | 3 (21,4) |
| O | 2 (18,2) | 9 (81,8) |

4.2 Genes de Virulência

A detecção dos genes de virulência indicou que, dentre aqueles de adesinas, *papA* e *csgA* não foram encontrados em amostras comensais (N). Os genes *papA*, *tsh* e *IpfaO141* não foram detectados em amostras de onfalite (O). Os genes *IpfaO141* e *iha* não foram detectados em amostras de síndrome da cabeça inchada (H). Todos os genes de adesinas foram detectados nas amostras de septicemia (S). Quanto aos genes de captação de ferro, todos os genes foram encontrados nos 4 grupos (N, S, H e O), exceto o gene *iucA*, que não foi identificado nas amostras de onfalite (O).

Dentre as amostras comensais, em 13 não foi detectado nenhum dos genes de adesina estudados e em 16 amostras não foi detectado nenhum dos genes de captação de ferro estudados. No total, 6 amostras comensais não apresentaram nenhum dos genes estudados. Todas as amostras septicêmicas (S) apresentaram ao menos um gene de adesina estudado, mas 9 não apresentaram nenhum dos genes de captação de ferro estudados. Todas as amostras de síndrome da cabeça inchada apresentaram ao menos um gene de adesina e captação de ferro, de forma que não houve nenhuma amostra H que não apresentou nenhum

gene. Em relação às amostras de onfalite (O), uma não apresentou nenhum dos genes de adesina estudados e 4 não apresentaram nenhum dos genes de captação de ferro estudados.

As tabelas 4 e 5 indicam o número de amostras (e a porcentagem), dentro de cada um dos grupos N, S, H e O que apresentaram os genes estudados. As figuras 2, 3 e 4 indicam quantos genes de virulência as amostras de cada grupo apresentaram. Estes resultados são apresentados em porcentagem.

Tabela 4. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de adesinas detectados por PCR. N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Genes de Adesinas - Número de amostras positivas nas PCRs | | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-----------------|-----------------|------------|
| Grupo | <i>fimA</i> | <i>papA</i> | <i>crl</i> | <i>csgA</i> | <i>tsh</i> | <i>lpfA0141</i> | <i>lpfA0154</i> | <i>iha</i> |
| N | 5 (16,7) | 0 (0) | 3 (10) | 0 (0) | 3 (10) | 1 (3,3) | 6 (20) | 4 (13,3) |
| S | 7 (29,2) | 6 (25) | 7 (29,2) | 21 (87,5) | 6 (25) | 6 (25) | 14 (58,3) | 5 (20,8) |
| H | 9 (64,3) | 5 (35,7) | 7 (50) | 9 (64,3) | 7 (50) | 0 (0) | 14 (100) | 0 (0) |
| O | 3 (27,3) | 0 (0) | 4 (36,4) | 6 (54,5) | 0 (0) | 0 (0) | 9 (81,8) | 2 (18,2) |

Tabela 5. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de captação de ferro detectados por PCR. N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Genes de Captação de ferro - Número de amostras positivas nas PCRs | | | | | |
|--|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Grupo | <i>fyuA</i> | <i>irp-2</i> | <i>iucA</i> | <i>fepC</i> | <i>sitA</i> |
| N | 4 (13,3) | 4 (13,3) | 2 (6,7) | 8 (26,7) | 8 (26,7) |
| S | 4 (16,7) | 5 (20,8) | 11 (45,8) | 7 (29,2) | 3 (12,5) |
| H | 8 (57,1) | 10 (71,4) | 6 (42,9) | 13 (92,9) | 4 (28,6) |
| O | 4 (36,4) | 4 (36,4) | 0 (0) | 5 (45,5) | 2 (18,2) |

A figura 2 indica a quantidade de genes de adesinas detectados por PCR para cada grupo de linhagens. Podemos verificar que em nenhuma linhagem foram identificados os 8 genes testados por PCR. As linhagens apresentaram, no máximo 5 genes. Dentro do grupo das linhagens comensais ou AFEC (N), podemos verificar a maior incidência de linhagens

nas quais nenhum gene foi detectado (mais de 40% das amostras não apresentaram nenhum gene de adesina); e quase a metade das amostras comensais apresentou um único gene de adesina. Em nenhuma linhagem foram detectados 5 genes. No grupo das linhagens septicêmicas (S), em mais de 35% das amostras foram detectados apenas 2 genes. E em mais de 20% das mesmas foram identificados 5 genes. No grupo de linhagens de síndrome da cabeça inchada (H) houve maior incidência de linhagens com número alto de genes: mais de 40% das amostras apresentou 4 genes e mais de 20% apresentou 5 genes. As linhagens de onfalite (O) apresentaram, no geral, maior número de genes do que as amostras comensais, mas dentre os grupos de APEC, foram as que apresentaram a menor incidência de genes de adesinas.

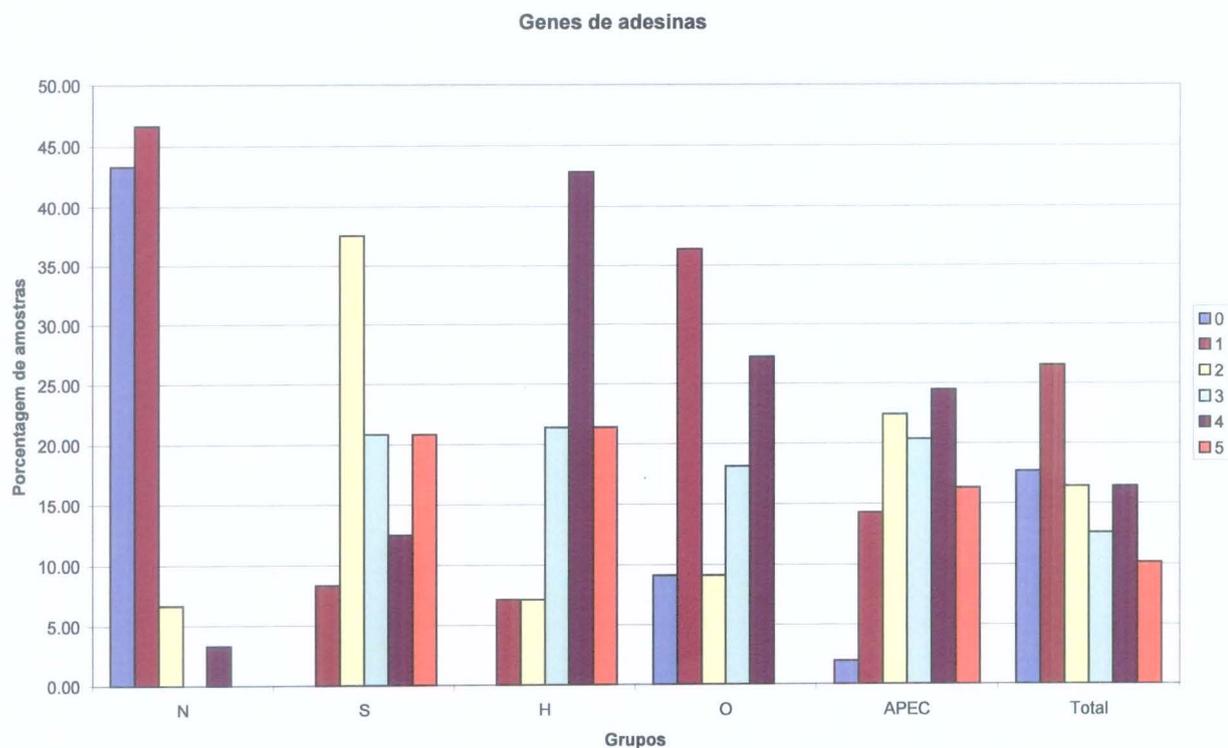


Fig. 2 Número de genes (de 0 a 5) de adesinas apresentado por cada grupo de linhagens, em porcentagens. S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite.

A figura 3 indica a quantidade de genes de captação de ferro detectados por PCR para cada grupo de linhagens. Apenas em linhagens septicêmicas (S) e de síndrome da cabeça inchada (H) foram detectados os 5 genes testados. Mais de 50% das linhagens comensais ou AFEC (N) não apresentaram nenhum gene e aproximadamente 20% apresentaram apenas 1 gene. Dentre as linhagens septicêmicas (S), quase 40% não apresentaram nenhum gene e mais de 20% apresentaram apenas 1 gene. Dentre as linhagens septicêmicas (H), todas apresentaram pelo menos 1 gene. Mais de 60% destas apresentaram 3 genes e em aproximadamente 20% das linhagens foram detectados todos os genes de captação de ferro testados por PCR. No grupo das linhagens associadas à onfalite (O), nenhuma apresentou todos os genes. Em cerca de 35% das amostras não foi identificado nenhum gene e em aproximadamente 30% das amostras foram identificados três genes.

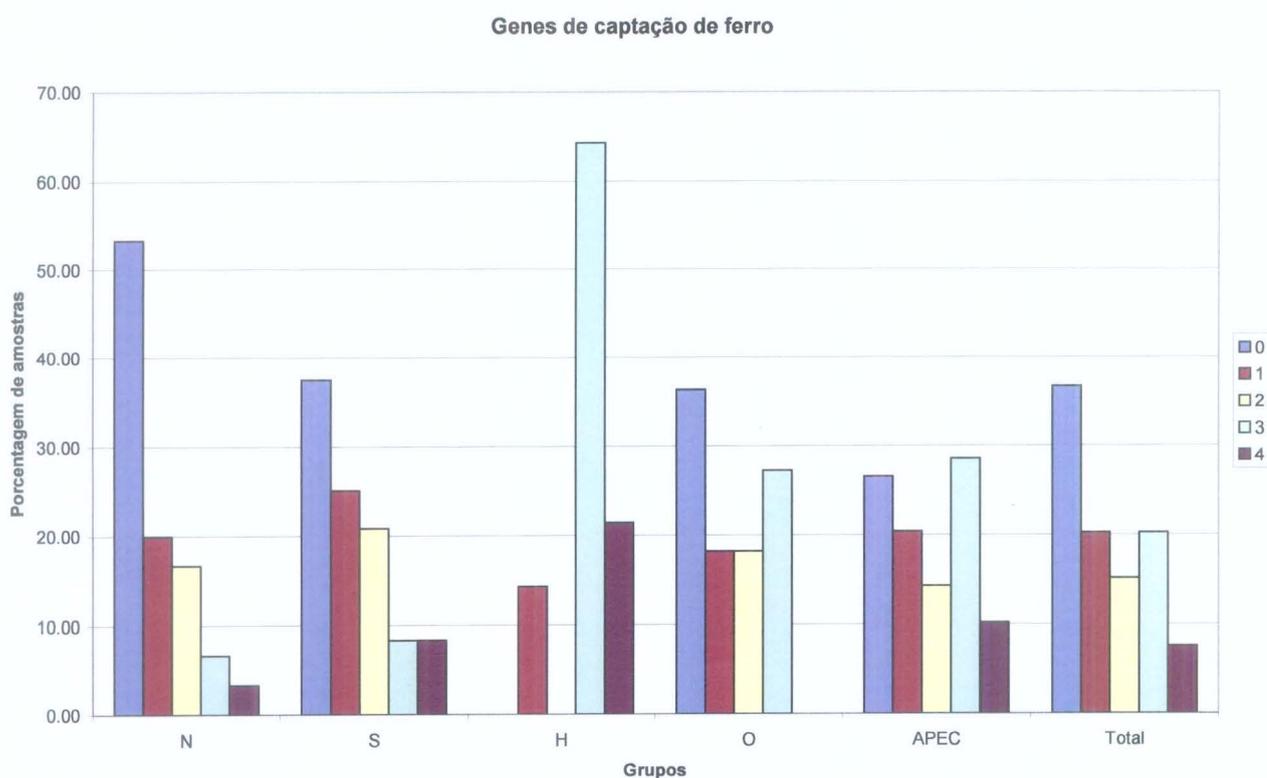


Fig. 3 Número de genes (de 0 a 4) de captação de ferro apresentado por cada grupo de linhagens, em percentagens. S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite.

Na figura 4, os genes de captação de ferro e adesinas foram tomados em conjunto para a apresentação dos dados. Nesta figura fica claro que o grupo de linhagens comensais ou AFEC (N) apresentaram a menor incidência de genes de virulência, seguidas pelas linhagens associadas à onfalite (O). As amostras septicêmicas apresentaram incidência alta de genes, além de uma grande diversidade no número de genes detectados, pois houve amostras com apenas 2 genes até amostras com 9 genes, enquanto para as amostras de síndrome da cabeça inchada (H), as quais apresentaram a maior incidência de genes de virulência, a amostra com menor quantidade de genes de virulência apresentou 4 genes e a amostra com maior número de genes apresentou 9 genes.

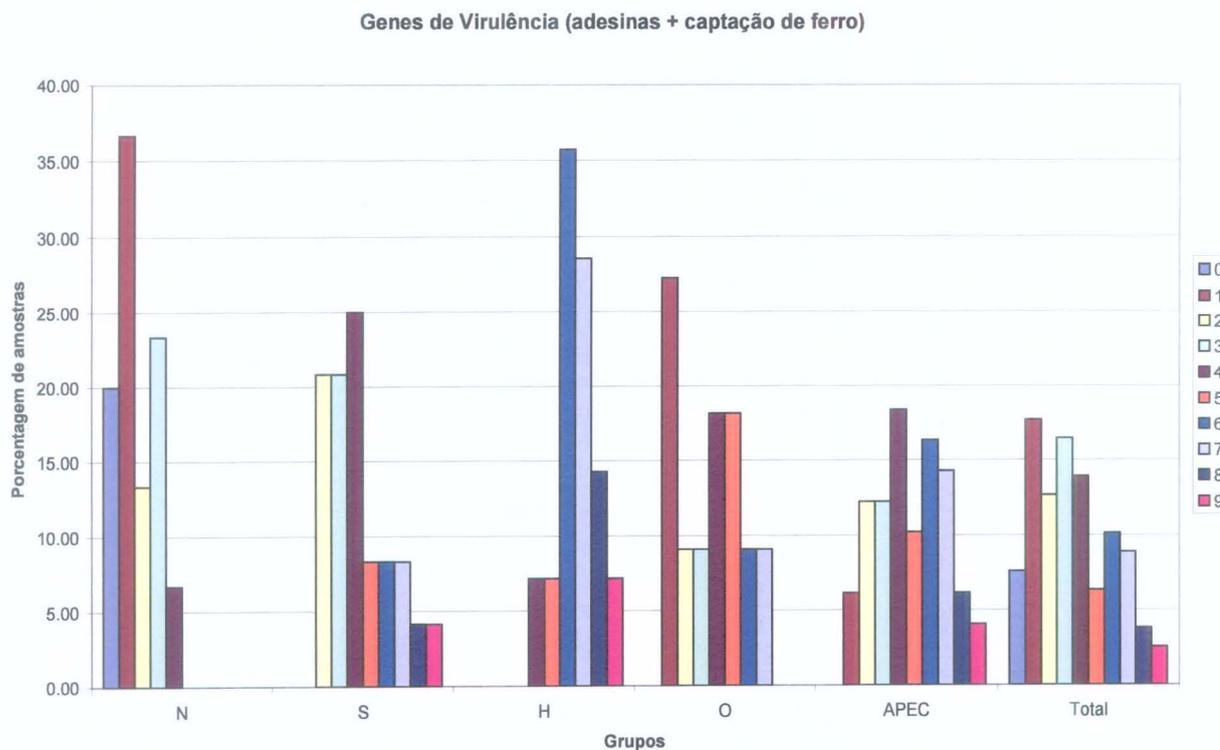


Fig. 4 Número de genes (de 0 a 4) de virulência apresentado por cada grupo de linhagens, em porcentagens. S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite.

4.3 Ilhas de Patogenicidade

Os resultados obtidos nas reações de PCR para os genes de ilhas de patogenicidade (PAI), apresentados na tabela 6, foram semelhantes àqueles obtidos para os genes de virulência (adesinas e captação de ferro), com o grupo das amostras de síndrome da cabeça inchada (H) apresentando a maior incidência de genes associados a PAIs, sendo que todos os genes testados foram detectados em amostras deste grupo. As amostras de onfalite (O), no entanto, foram aquelas que apresentaram a menor incidência de genes associados a PAIs. Dentre os 6 genes testados, 4 (*tia*, *ireA*, *papA*, *papGIIA*) não foram identificados em nenhuma amostra. No caso das amostras comensais ou AFEC (N), os genes *papA* e *PAI* não foram detectados em nenhuma amostra.

Tabela 6. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os genes de ilhas de patogenicidade detectados por PCR. N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Ilhas de Patogenicidade - número de amostras positivas nas PCRs | | | | | | |
|---|------------|-------------|--------------------------|----------------|----------|-----------------------|
| Grupo | <i>tia</i> | <i>ireA</i> | PAI I _{APEC-01} | | PAI | PAI I _{UPEC} |
| | | | <i>papA</i> | <i>papGIIA</i> | | <i>fyu</i> |
| N | 1 (3,3) | 4 (13,3) | 0 (0) | 2 (6,7) | 0 (0) | 4 (13,3) |
| S | 1 (4,2) | 8 (33,3) | 6 (25) | 1 (4,2) | 1 (4,2) | 4 (16,7) |
| H | 3 (21,4) | 4 (28,6) | 5 (35,7) | 4 (28,6) | 3 (21,4) | 8 (57,1) |
| O | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (18,2) | 4 (36,4) |

4.4. Teste de Patogenicidade: Dose Letal 50% (LD₅₀)

Os valores de dose letal 50% das linhagens APEC e AFEC analisados nesse estudo foram determinados em ensaios previamente realizados por Silveira *et al.* (2002a), conforme metodologia descrita por Silveira *et al.* (1994). Brevemente, as linhagens de Onfalite (O) e comensais ou AFEC (N) apresentaram os valores mais altos para DL₅₀, sendo que tais valores foram sempre maiores do que 10¹⁰ células/mL e nenhuma ave foi morta pela infecção. Para amostras septicêmicas, os valores encontrados variaram entre

baixas doses e altas doses de infecção. Todas as amostras de síndrome da cabeça inchada apresentaram doses de infecção variando entre 10^9 e 10^7 células/mL.

Tabela 7. Dose letal 50% (DL_{50}) das amostras de *E. coli* de origem aviária estudadas. Os valores de dose letal 50% das linhagens APEC e AFEC analisados nesse estudo foram determinados em ensaios previamente realizados por Silveira *et al.* (2002a), conforme metodologia descrita por Silveira *et al.* (1994). As doses estão em células/mL. N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Grupo | Dose Letal 50% (DL_{50}) | | |
|-------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | $DL_{50} > 10^{10}$ | $DL_{50} = 10^9 - 10^7$ | $DL_{50} = 10^6 - 10^5$ |
| N | 30 (100) | 0 (0) | 0 (0) |
| S | 10 (41,6) | 11 (45,8) | 3 (12,6) |
| H | 0 (0) | 14 (100) | 0 (0) |
| O | 11 (100) | 0 (0) | 0 (0) |

4.5. Ensaio de formação de biofilme

O teste com cristal violeta demonstrou altos níveis de adesão em algumas amostras dentro de todos os grupos estudados, sugerindo capacidade de formação de biofilme, tanto no grupo de bactérias comensais quanto nos três grupos de bactérias patogênicas (Figs. 5, 6 e 7). Dentre as amostras testadas, aquelas que apresentaram níveis de adesão particularmente altos e são candidatas para testes posteriores quanto às outras características biológicas são: O1, O3 e O5 para o grupo de linhagens associadas à onfalite; 255, 362, S1, S4, S7, S14 e S17 para o grupo de linhagens associadas à septicemia; H3, H4, H12, H14 para o grupo de linhagens associadas à síndrome da cabeça inchada; e N3, N9 e N5 para o grupo de linhagens comensais (AFEC).

O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ($H = 6,2893$; $GL = 3$; $p = 0,0984$) indicou que não há diferença significativa na capacidade de formação de biofilme entre as linhagens associadas aos diferentes grupos de doenças (septicemia, onfalite e síndrome da cabeça inchada). Indicou, também, que não há diferença entre a capacidade de formação de biofilme quando comparado o grupo de bactérias patogênicas com o grupo de comensais.

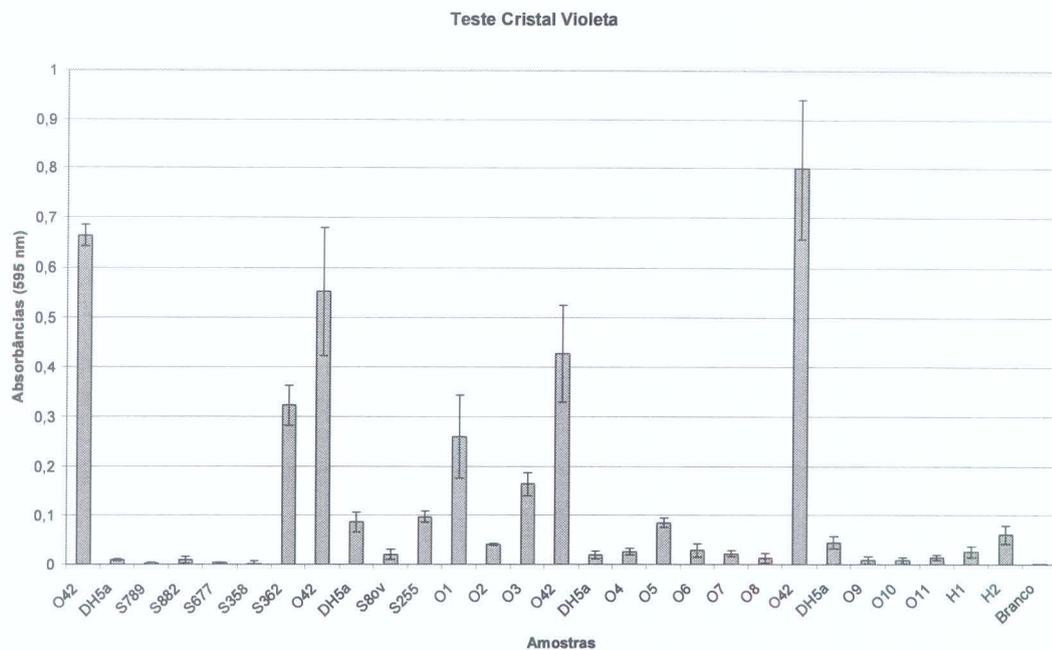


Fig. 5. Teste de formação de biofilme utilizando cristal violeta. Branco representa meio LB utilizado como controle negativo (absorbância = 0). O42 é uma amostra enteroagregativa de *E.coli* com alta capacidade de formação de biofilme. DH5a é uma amostra de *E. coli* com baixa capacidade de formação de biofilme, utilizada como controle negativo. S representa amostras causadoras de septicemia, O representa amostras causadoras de onfalite, H representa amostras causadoras de síndrome da cabeça inchada, e N representa amostras AFEC.

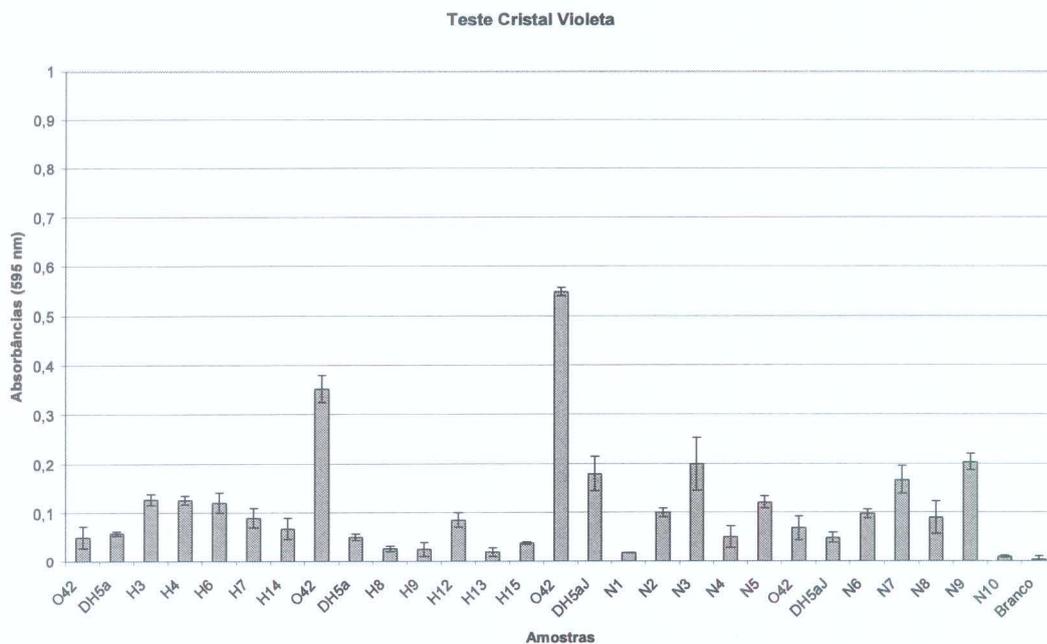


Fig. 6. Teste de formação de biofilme utilizando cristal violeta. Branco representa meio LB utilizado como controle negativo (absorbância = 0). O42 é uma amostra enteroagregativa de *E.coli* com alta capacidade de

formação de biofilme. DH5 α é uma amostra de *E. coli* com baixa capacidade de formação de biofilme, utilizada como controle negativo. S representa amostras causadoras de septicemia, O representa amostras causadoras de onfalite, H representa amostras causadoras de síndrome da cabeça inchada, e N representa amostras AFEC.

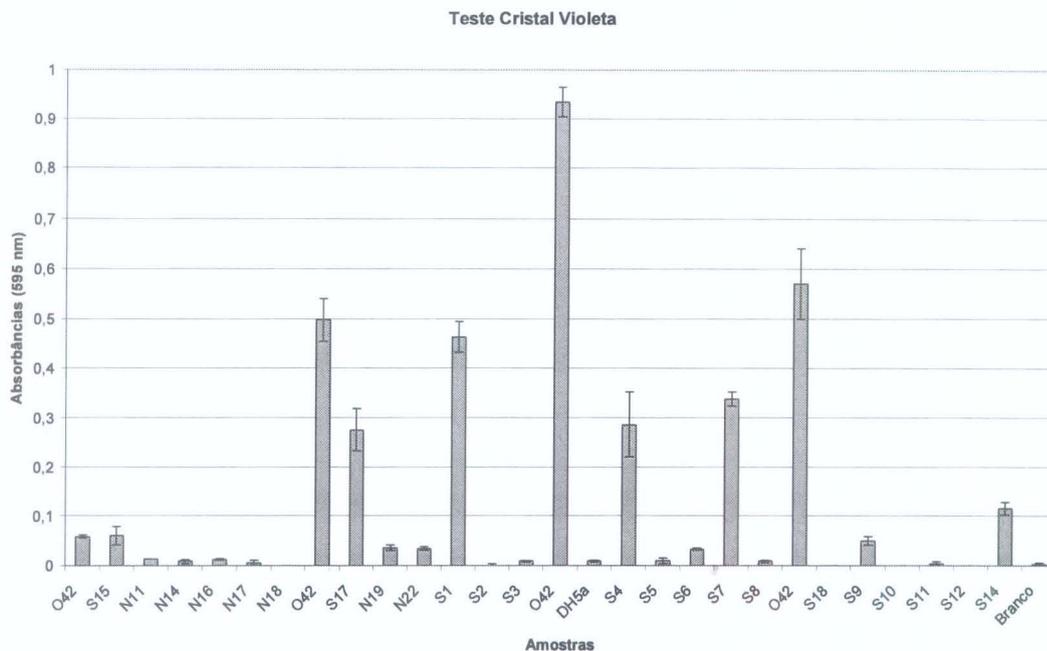


Fig. 7. Teste de formação de biofilme utilizando cristal violeta. Branco representa meio LB utilizado como controle negativo (absorbância = 0). O42 é uma amostra enteroagregativa de *E. coli* com alta capacidade de formação de biofilme. DH5 α é uma amostra de *E. coli* com baixa capacidade de formação de biofilme, utilizada como controle negativo. S representa amostras causadoras de septicemia, O representa amostras causadoras de onfalite, H representa amostras causadoras de síndrome da cabeça inchada, e N representa amostras AFEC.

4.6. Produção de molécula auto-indutora de *Quorum sensing*

Os meios pré-condicionados obtidos a partir de todas as amostras testadas, representando todos os grupos de doenças, além de amostras comensais, foram capazes de induzir maior atividade enzimática em relação ao meio LB puro (não condicionado), indicando presença de molécula sinalizadora AI-3 em todos os grupos, ainda que nem todas as amostras tenham se demonstrado valores de adesão estatisticamente diferentes daqueles apresentados por meio não condicionado. (Fig. 8).

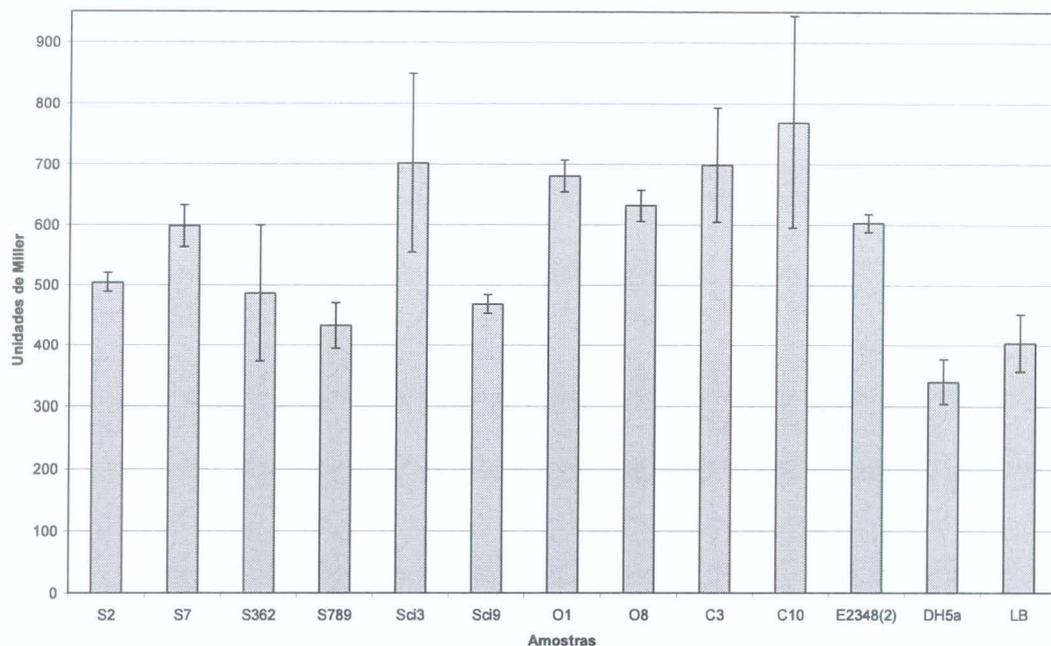


Fig. 8: Verificação da produção de autoindutor AI-3 utilizando ensaio da enzima β -galactosidase. Os valores de atividade enzimática são apresentados em unidades de Miller. LB representa o meio de cultura, utilizado como controle negativo. DH5 α é uma amostra de *E. coli* com baixa capacidade de formação de biofilme e baixa eficiência do sistema de “quorum sensing”, utilizada como controle negativo. E2348(2) é uma amostra de *E. coli* enteropatogênica com capacidade de formação de biofilme e presença de sistema de “quorum sensing” previamente demonstradas (Nataro & Kaper, 1998). S representa amostras causadoras de septicemia, O representa amostras causadoras de onfalite, H representa amostras causadoras de síndrome da cabeça inchada, e N representa amostras AFEC.

4.7 Teste de adesão em células HeLa e Hep-2

Com relação ao teste de adesão, houve diferença nos resultados obtidos na presença e ausência de manose (tabela 8), indicando participação de outras fímbrias além da fímbria tipo 1. Para o teste na ausência de manose, os resultados obtidos foram: 16 (53,3%) das amostras comensais ou AFEC (N) demonstraram capacidade de adesão a células HeLa e 28 (93,3%) a células Hep-2; 17 (70,8%) das amostras septicêmicas (S) apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e 14 (58,8%) a células Hep-2; 13 (92,9%) das amostras de síndrome da cabeça inchada apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e Hep-2 (apenas uma linhagem de síndrome da cabeça inchada não apresentou capacidade de adesão a nenhum tipo dessas células, na ausência de manose). Dentre as

amostras de onfalite (O), 3 (27,3%) apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e 2 (18,2%) a células Hep-2.

Para o teste de adesão na presença de manose, que indica adesão via fimbria que não do tipo 1, os resultados obtidos foram: 6 (20%) das amostras comensais ou AFEC (N) demonstraram capacidade de adesão a células HeLa e 19 (63,3%) a células Hep-2; 13 (54,2%) das amostras septicêmicas (S) apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e 10 (41,7%) a células Hep-2; 13 (92,9%) das amostras de síndrome da cabeça inchada (H) apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e 11 (78,6%) a células Hep-2. Dentre as amostras de onfalite (O), 3 (27,3%) apresentaram capacidade de adesão a células HeLa e 2 (18,2%) a células Hep-2.

4.8. Teste de Adesão em Células Epiteliais de Traquéia

O teste de adesão em células epiteliais de traquéia (tabela 8) indicou, no geral, menor número de linhagens com adesão positiva. Dentre as amostras comensais, 20 (66,7%) das amostras comensais ou AFEC (N) apresentaram capacidade de adesão a células epiteliais de traquéia na ausência de manose e 10 (33,33%) apresentaram capacidade de adesão na presença de manose. Dentre as linhagens septicêmicas (S), 11 (45,8%) amostras apresentaram capacidade de adesão a células epiteliais de traquéia na ausência de manose, enquanto 8 (33,33%) apresentaram capacidade de adesão na presença de manose. Dentre as linhagens de síndrome da cabeça inchada (H), 10 (71,4%) e 6 (42,9%) apresentaram capacidade de adesão a células epiteliais de traquéia na ausência e presença de manose, respectivamente. Dentre as linhagens de onfalite (O), 4 (36,4%) e 1 (9,1%) apresentaram capacidade de adesão a células epiteliais de traquéia na ausência e presença de manose, respectivamente.

Tabela 8. Número de linhagens de *E. coli* de origem aviária que apresentaram resultado positivo para os testes de adesão em células HeLa, Hep-2 e em células epiteliais de traquéia, na presença e ausência de manose. N = linhagens isoladas da região cloacal de aves sem sinais clínicos de doença, denominadas comensais; S = linhagens isoladas de aves com septicemia; H = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens isoladas de aves com sinais clínicos de onfalite. Os números entre parênteses correspondem às porcentagens.

| Ensaio de Adesão - Número de amostras com adesão positiva | | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Grupo | TraquéiaSM | TraquéiaCM | HeLaSM | HeLaCM | Hep-2SM | Hep-2CM |
| C | 20 (66,7) | 10 (33,3) | 16 (53,3) | 6 (20,0) | 28 (93,3) | 19 (63,3) |
| S | 11 (45,8) | 8 (33,3) | 17 (70,8) | 13 (54,2) | 14 (58,3) | 10 (41,7) |
| H | 10 (71,4) | 6 (42,9) | 13 (92,9) | 13 (92,9) | 13 (92,9) | 11 (78,6) |
| O | 4 (36,4) | 1 (9,1) | 3 (27,3) | 3 (27,3) | 2 (18,2) | 2 (18,2) |

SM = sem manose; CM = com manose.

4.9. Análise Estatística

4.9.1. Análise de Correspondência (CA)

A figura 9 consiste em uma representação bidimensional dos resultados obtidos pela análise de correspondência (CA). O eixo horizontal é responsável por 65,54% da inércia total e o eixo vertical é responsável por 18,16% da inércia total. O valor total de Qui-quadrado foi 209,137 (d.f. = 75) e a inércia total foi (0,30112). De acordo com essa análise, portanto, os grupos que mais se diferenciam no que diz respeito à distribuição dos traços verificados são Síndrome da Cabeça Inchada (H) e Comensais, ou AFEC (N). Em seguida, os dois grupos que mais se diferenciam na distribuição dos traços são Septicêmicas e Comensais. A terceira maior distância é aquela entre Síndrome da Cabeça Inchada (H) e Onfalite (O). A menor distância encontrada, isto é, os dois grupos que menos se diferenciam na distribuição dos traços são Síndrome da Cabeça Inchada (H) e Septicemia (S).

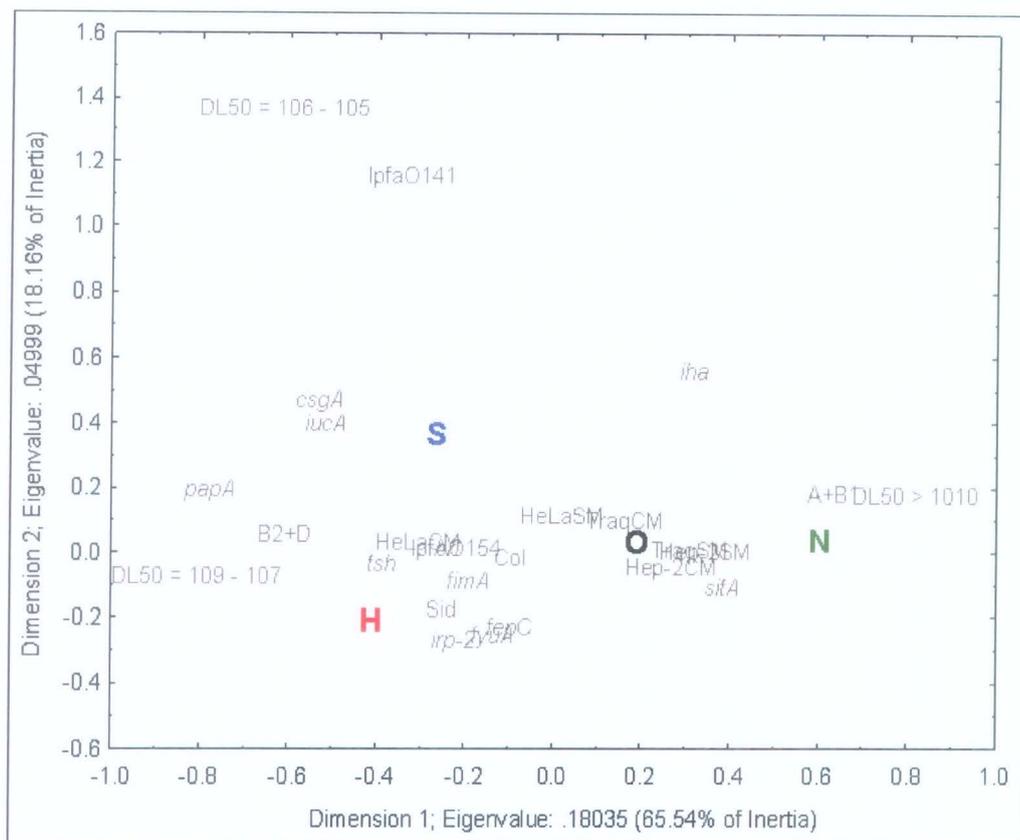


Fig 9. Análise de Correspondência (CA) dos 24 traços estudados. N = linhagens comensais; S = linhagens septicêmicas, H = linhagens de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens de onfalite..

4.9.2. Teste G

O valor do teste G foi de 211,3361 com d.f. = 63; e $p < 0,001$. Isso indica que os quatro grupos diferem entre si no padrão de distribuição dos traços analisados.

4.9.3. Análise de Componente Principal (PCA)

A figura 10 consiste em uma representação tridimensional dos resultados obtidos pela análise de componente principal. O modelo PCA construído resultou em 22 fatores que explicam um autovalor de 24,00. O fator 1 é responsável por 21,99% da inércia total (autovalor = 5,27) e o fator 2 é responsável por 11,49% da inércia total (autovalor = 2,75). A tabela K apresenta a contribuição relativa das variáveis para cinco fatores.

Na figura 10 é possível observar que as linhagens septicêmicas apresentam-se dispersas por toda a área do gráfico, enquanto as linhagens de síndrome da cabeça inchada (H), comensais (N) e de onfalite (O) aparentemente formam grupos específicos, com sobreposição entre O e N.

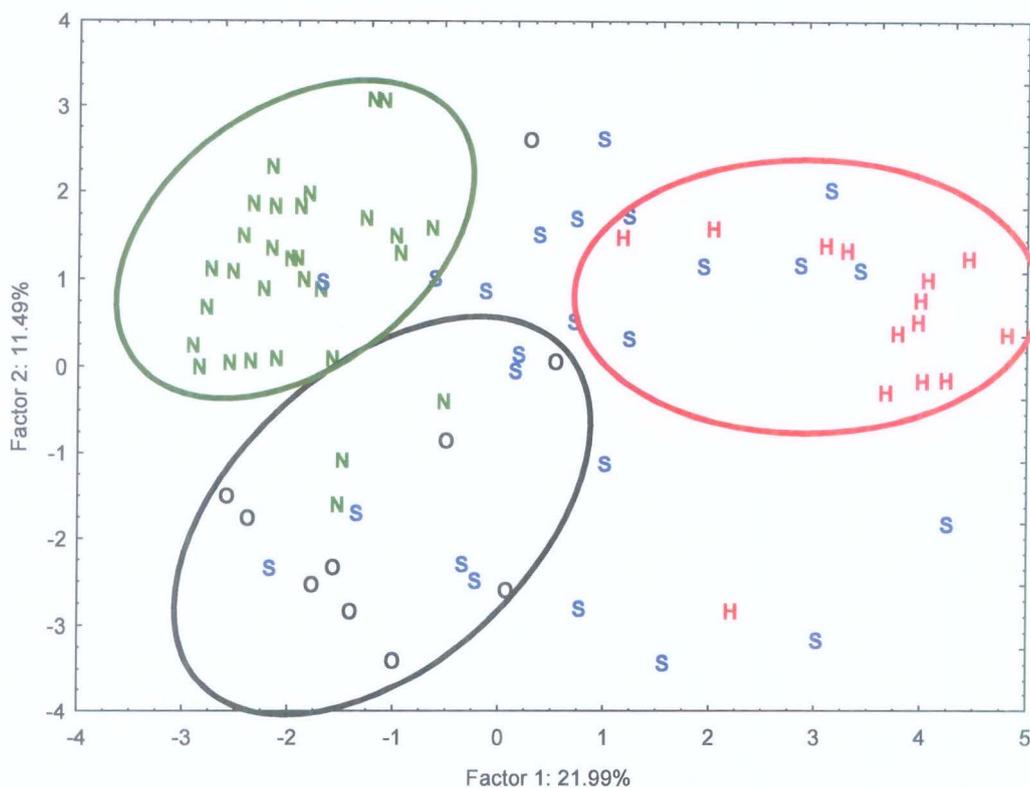


Fig. 10. Análise de componente principal (PCA) dos 24 traços estudados. N = linhagens comensais; S = linhagens septicêmicas, H = linhagens de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens de onfalite.

Na tabela 9, os traços com contribuição para a distribuição das linhagens superior a 2% para os fatores 1 e 2 estão destacados em vermelho. É possível observar que os traços que mais contribuíram para o fator 1 foram os grupos filogenéticos e os valores de dose letal obtidos nos ensaios de patogenicidade ($L_{50} > 10^{10}$ e $10^9 > DL_{50} < 10^7$); e para o fator 2 foram os ensaios de adesão e a presença do gene *lpfAO154*.

Tabela 9. Análise de Componente Principal (PCA). Contribuição relativa das variáveis para os cinco fatores mais importantes. Os valores estão em porcentagem. Os valores destacados em vermelho são referentes às variáveis que mais contribuíram para a distribuição das linhagens.

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 |
|--|--------------|--------------|----------|----------|----------|
| <i>fimA</i> | 3,39 | 0,76 | 4,87 | 7,84 | 1,41 |
| <i>papA</i> | 4,00 | 0,32 | 9,27 | 1,16 | 0,00 |
| <i>CrI</i> | 0,84 | 0,02 | 2,89 | 4,79 | 4,72 |
| <i>csgA</i> | 5,16 | 4,14 | 1,45 | 0,65 | 11,98 |
| <i>Tsh</i> | 2,47 | 0,95 | 2,33 | 1,44 | 16,92 |
| IpfaO141 | 0,60 | 0,75 | 7,01 | 21,19 | 1,03 |
| IpfaO154 | 4,44 | 9,61 | 0,12 | 1,31 | 0,57 |
| <i>lha</i> | 0,03 | 0,06 | 4,09 | 24,53 | 1,02 |
| <i>fyuA</i> | 2,14 | 3,40 | 5,12 | 8,58 | 0,87 |
| <i>irp-2</i> | 3,92 | 4,13 | 2,68 | 10,84 | 4,17 |
| <i>iucA</i> | 5,29 | 0,13 | 1,06 | 0,08 | 0,00 |
| <i>fepC</i> | 4,87 | 0,03 | 0,00 | 0,96 | 15,64 |
| <i>sitA</i> | 0,18 | 0,64 | 9,67 | 5,70 | 5,97 |
| Traq SM | 0,04 | 4,80 | 18,59 | 1,01 | 11,84 |
| Traq CM | 0,67 | 3,88 | 18,77 | 5,17 | 2,74 |
| HeLaSM | 3,78 | 13,32 | 2,76 | 0,11 | 3,27 |
| HeLaCM | 8,07 | 7,49 | 0,97 | 0,05 | 1,00 |
| Hep-2SM | 0,17 | 25,64 | 0,02 | 0,57 | 0,01 |
| Hep-2CM | 0,72 | 19,42 | 0,94 | 0,00 | 0,49 |
| P (B2 + D) | 11,30 | 0,21 | 0,23 | 0,33 | 3,20 |
| NP (A + B1) | 11,30 | 0,21 | 0,23 | 0,33 | 3,20 |
| DL ₅₀ > 10 ¹⁰ | 13,44 | 0,01 | 1,36 | 0,26 | 1,86 |
| DL ₅₀ = 10 ⁹ - 10 ⁷ | 13,02 | 0,00 | 0,06 | 1,20 | 0,06 |
| DL ₅₀ = 10 ⁶ - 10 ⁵ | 0,15 | 0,05 | 5,50 | 1,92 | 8,02 |

4.9.4. Algoritmo “K-means”

A composição dos grupos formados pelo algoritmo “K-means” variou de acordo com o número de grupos formados. Para dois grupos, a composição de cada um deles está

demonstrada na tabela 10. Os traços que apresentaram variância maior entre os grupos do que dentro dos grupos foram $DL_{50} > 10^{10}$ and $DL_{50} = 10^9 - 10^7$.

Para três grupos, a composição é apresentada na tabela 11. Os traços que apresentaram variância maior entre os grupos do que dentro dos grupos foram $DL_{50} > 10^{10}$, $DL_{50} = 10^9 - 10^7$ e Hep-2 SM. Para quatro grupos, a composição de cada um é apresentada na tabela 12.

Os resultados obtidos utilizando-se o algoritmo K-means sugerem que a patogenicidade e o perfil de adesão (particularmente em células Hep-2) são, dentre as características testadas, as duas principais forças que moldam a estrutura dessa população de linhagens.

Tabela 10. Composição dos dois grupos obtidos pelo algoritmo K-means.

| | Cluster 1 | Cluster 2 |
|----------|------------------|------------------|
| N | 0% | 100% |
| S | 54.17% | 45.83% |
| H | 100% | 0% |
| O | 0% | 100% |

Tabela 11. Composição dos três grupos obtidos pelo algoritmo K-means.

| | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| N | 90% | 0% | 10% |
| S | 33.33% | 33.33% | 33.33% |
| H | 0% | 92.85% | 7.14% |
| O | 18.18% | 0% | 81.81% |

Tabela 12. Composição dos quatro grupos obtidos pelo algoritmo K-means.

| | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| N | 93.33% | 6.67% | 0.00% | 0.00% |
| S | 8.33% | 25.00% | 8.33% | 58.33% |
| H | 0.00% | 0.00% | 64.29% | 35.71% |
| O | 9.09% | 81.82% | 0.00% | 9.09% |

4.9.5. Análise de Função Discriminante (DA)

A análise de função discriminante permitiu a discriminação dos grupos N, S, H e O por 15 traços (csgA, Hep-2 SM, lpfAO154, HeLa CM, lpfaO141, A+B1, fepC, iha, crl, papA, tsh, irp-2, Traq SM, iucA e sitA) (Wilks' Lambda: 0,05225 aprox. $F(45,181) = 6,8788$ $p < 0,0000$). Usando este modelo, 91,13% dos isolados foram corretamente classificados de acordo com os grupos N,S, H e O. Os resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os grupos N, S, H e O. N = linhagens comensais; S = linhagens septicêmicas H = linhagens de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens de onfalite. Linhas: classificações observadas. Colunas: Classificação predita.

| | Correta associação | N | S | H | O |
|-------|--------------------|----|----|----|----|
| N | 100 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| S | 83.34 | 0 | 20 | 2 | 2 |
| H | 92.85 | 0 | 0 | 13 | 1 |
| O | 81.81 | 1 | 0 | 1 | 9 |
| Total | 91.13 | 31 | 20 | 16 | 12 |

As variáveis utilizadas no modelo de DA construído para separa os isolados de acordo com os níveis de patogenicidade – baixo, médio e alto – obtidos pelos testes de LD₅₀ foram: csgA, lpfAO154, HeLa CM, A+B1, fepC, iha, papA, tsh, Traq SM and iucA (Wilks' Lambda: 0,33228 approx. $F(20,134) = 4,9232$ $p < 0,0000$). Os resultados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os níveis de patogenicidade – baixo, médio e alto – obtidas pelos testes de LD₅₀. Linhas: classificações observadas. Colunas: Classificação predita.

| | Correta associação | Baixo | Médio | Alto |
|-------|--------------------|-------|-------|------|
| Baixo | 92.15 | 47 | 3 | 1 |
| Médio | 72.00 | 6 | 18 | 1 |
| Alto | 66.66 | 1 | 0 | 2 |
| Total | 84.81 | 54 | 21 | 4 |

A melhor classificação foi obtida para o modelo de DA construído com para separar os isolados nos grupos obtidos pelo algoritmo K-means (Wilks' Lambda: 0,02337 aprox. $F(28,126) = 24,934$ $p < 0,0000$). Aproximadamente 98% dos isolados foram classificados corretamente em um dos três grupos. As variáveis discriminantes indicadas por este modelo foram Hep-2 SM, $10^6 > DL_{50} < 10^5$, lpfAO154, iucA, Traq CM, fyuA, papA, tsh, fimA, pepC, Hep-2 CM, A+B1, sitA e irp-2. Os resultados estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os 3 grupos obtidos pelo algoritmo K-means. Linhas: classificações observadas. Colunas: Classificações preditas.

| | Correta associação | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|----------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Grupo 1 | 100,00 | 37 | 0 | 0 |
| Grupo 2 | 100,00 | 0 | 21 | 0 |
| Grupo 3 | 95,24 | 1 | 0 | 20 |
| Total | 98,73 | 38 | 21 | 20 |

As variáveis usadas na construção do modelo DA que melhor discriminaram as linhagens de acordo com os grupos AFEC e APEC foram: csgA, lpfAO154, HeLa CM, Hep-2 SM, $DL_{50} > 10^{10}$, sitA, A+B1, TraqCM, $10^6 > DL_{50} < 10^5$, cri e fimA (Wilks' Lambda: 0,23952 aprox. $F(11,67) = 19,338$ $p < 0,0000$). O modelo permitiu 96% de classificação correta dos isolados. Os resultados estão expostos na tabela 16.

Tabela 16. Matriz de classificação usando o modelo DA para discriminar entre os grupos AFEC e APEC. Linhas: classificações observadas. Colunas: Classificações preditas.

| | Correta associação | AFEC | APEC |
|--------------|---------------------------|-------------|-------------|
| AFEC | 96,67 | 29 | 1 |
| APEC | 95,92 | 2 | 47 |
| Total | 96,20 | 31 | 48 |

A separação nos 3 grupos obtidos pelo algoritmo K-means parece ser a melhor para os isolados analisados. O grupo 1 (composto por 90% dos isolados N, por 18% de isolados O e 1/3 dos isolados S – tabela 11) é caracterizado por baixa dose de patogenicidade (determinada por LD₅₀), baixa frequência de fatores de virulência, predominância dos filogrupos A e B1, boa capacidade de adesão, especialmente em células Hep-2. O grupo 2 (composto por aproximadamente 93% de isolados H e por 1/3 dos isolados S) é caracterizado por dose intermediária de patogenicidade, alta frequência de fatores de virulência, predominância dos filogrupos B2 e D, boa capacidade de adesão, especialmente em células HeLa na ausência de manose. O grupo 3 (composto por aproximadamente 82% dos isolados O, 1/3 dos isolados S, 10% dos isolados N e 7% dos isolados H) é caracterizado por baixa patogenicidade, baixa frequência de fatores de virulência, alta frequência de IpfaO154 e predominância dos filogrupos A e B1, baixa capacidade de adesão e completa ausência de adesão em células Hep-2 na presença de manose.

Uma vez que o grupo das amostras septicêmicas (S) apresentou a diversidade mais alta nos isolados (fig. 10) e a maior incidência de associações incorretas (tabela 13), realizamos uma PCA utilizando apenas os isolados N, H e O (Fig. 11). Por esta figura, fica claro que o fator 1 é responsável pela separação entre H e N/O, e o fator 2 é responsável por contribuir para a separação entre N e O. As variáveis que mais contribuíram para o fator 1 foram os níveis de dose letal (LD₅₀) e os grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D); e para o fator 2 foram os ensaios de adesão e a presença de IpfaO154.

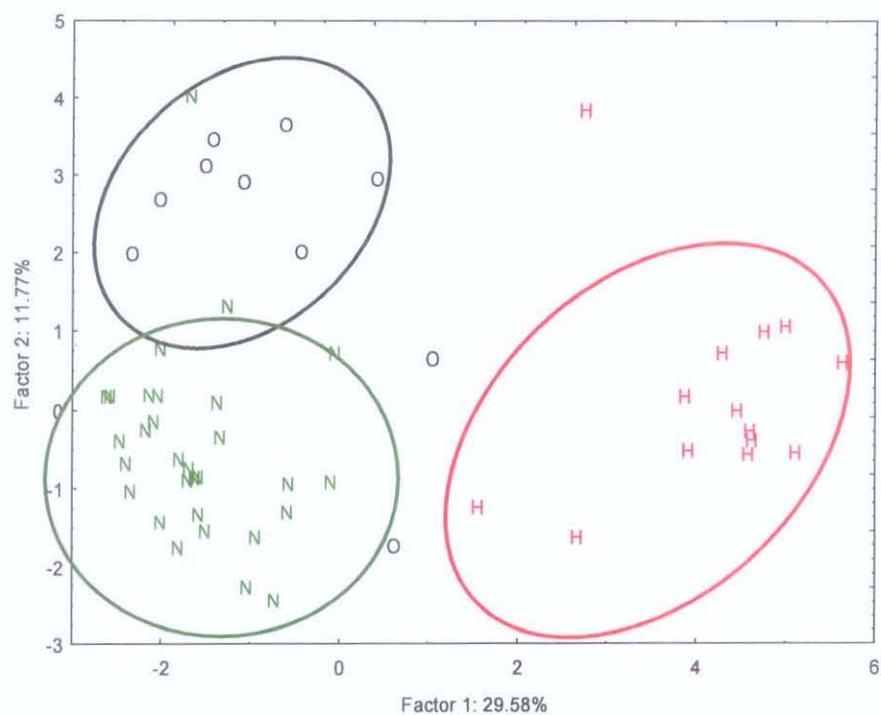


Fig. 11. Análise de componente principal (PCA) dos 24 traços estudados, excluindo-se as amostras septicêmicas (S). N = linhagens comensais; H = linhagens de síndrome da cabeça inchada; O = linhagens de onfalite.

4.10. Rede Complexa

O índice de modularidade, M , foi significativamente maior que aquele de redes aleatórias de tamanho similar ($P < 0,001$). O algoritmo AS identificou 3 módulos e tamanho similar (fig 12). O primeiro módulo, MI, é composto por 29 (97%) linhagens comensais, 3 (12,5%) septicêmicas, 1 (7,1%) de síndrome da cabeça inchada e 4 (36%) de onfalite. O segundo módulo, MII, contém 7 (64%) linhagens de onfalite, além de 5 (36%) linhagens de síndrome da cabeça inchada e 6 (25%) das linhagens septicêmicas. O terceiro módulo, MIII, é composto por 15 (62%) linhagens de septicemia e 8 (57%) linhagens de síndrome da cabeça inchada.

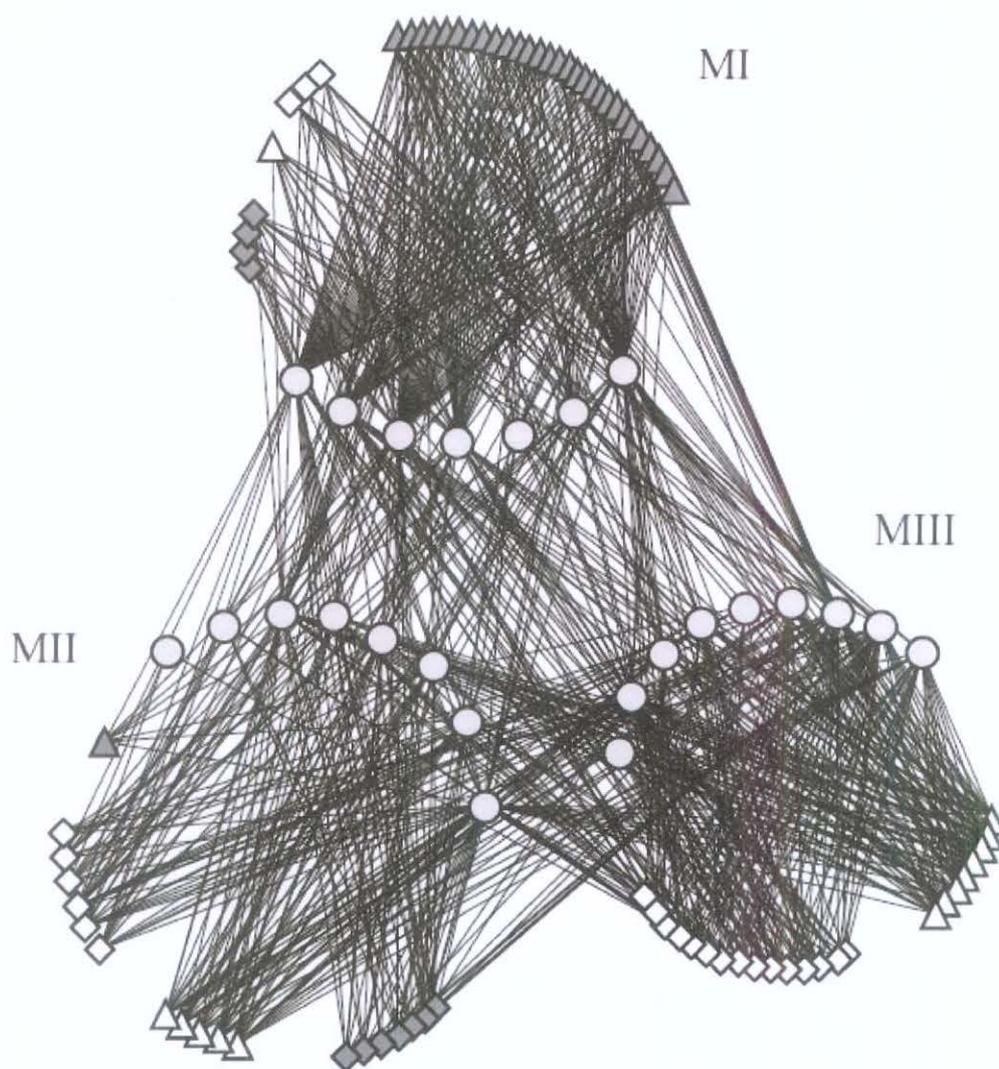


Fig. 12. Representação em rede da ocorrência de cada característica biológica analisada nas linhagens de *E. coli*. Os círculos representam cada característica biológica estudada. Linhagens de diferentes grupos patológicos são representadas por diferentes combinações de figuras geométricas e cores: triângulos cinza = linhagens comensais; diamantes cinza = onfalite; triângulos brancos = síndrome da cabeça inchada; diamantes brancos = septicemia. Ligação entre uma linhagem e uma característica biológica indica que tal característica foi detectada naquela linhagem. Cada módulo identificado pelo algoritmo SA está destacado e nomeado pela letra M acompanhada por seu número correspondente.

5. Discussão

Neste estudo, objetivou-se testar a possibilidade de um grupo de amostras APEC estar estruturado de acordo com as doenças causadas pelas diferentes linhagens, de forma que o grupo entendido como APEC na verdade se constitui de diferentes subgrupos (potenciais patótipos ou subpatótipos), não constituindo um único grupo homogêneo. A possibilidade de APEC abrigar diferentes subgrupos foi apontada em outros trabalhos (Delicato *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Entretanto, a relação entre tais possíveis subgrupos e as diferentes síndromes clínicas causadas por linhagens APEC não foi profundamente averiguada.

Os resultados obtidos, neste trabalho, corroboram dados recentes de que amostras APEC são biologicamente (genética e fenotipicamente) distintas de amostras AFEC, estando adaptadas a um estilo de vida patogênico. Em relação ao grupo de linhagens APEC, o presente trabalho indica que a população de amostras está estruturada de acordo com os grupos patogênicos, havendo ao menos dois grupos distintos: um composto majoritariamente por linhagens associadas à onfalite e outro composto majoritariamente por linhagens associadas à síndrome da cabeça inchada. Assim, amostras causadoras de síndrome da cabeça inchada tendem a apresentar maior semelhança a outras amostras de síndrome de cabeça inchada do que em relação a amostras APEC associadas a outras condições patológicas. O mesmo é válido para linhagens causadoras de onfalite. Duas outras observações são de extrema relevância: linhagens septicêmicas parecem não formar um grupo coeso, sobrepondo-se às linhagens associadas a outras doenças; e as linhagens associadas à onfalite, embora apresentem tendência a formarem um grupo coeso, possuem uma similaridade muito maior com linhagens AFEC do que aquela apresentada entre AFEC e síndrome da cabeça inchada. Isso sugere que dificuldades em caracterizar o patótipo de APEC pode se dever ao fato de que APEC não consiste em um patótipo, em um grupo único, mas em um conjunto estruturado de patótipos ou subpatótipos relacionados a várias doenças, sendo que alguns desses subgrupos são mais similares a linhagens comensais do que outros. Isso explicaria a dificuldade em se estabelecer um método exato para distinguir linhagens AFEC de linhagens APEC (Johnson *et al.*, 2008). Um nível de resolução que permite discriminação entre linhagens que se encontram nos extremos (as menos

semelhantes), como AFEC e síndrome da cabeça inchada, pode não permitir diferenciação entre linhagens pertencentes a grupos mais similares, como AFEC e onfalite. Assim, algumas linhagens APEC serão frequentemente classificadas erroneamente em AFEC e vice-versa. É plausível, porém, que haja um fator ou um conjunto de fatores envolvidos na patogênese e compartilhados por todos os subgrupos de APEC, dada a natureza extra-intestinal deste patógeno (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Caso estes fatores sejam elucidados e empregados como parâmetro de discriminação, talvez seja possível discriminar entre linhagens APEC e AFEC. Entretanto, enquanto forem empregadas características biológicas mais gerais, é esperado que ocorram erros de classificação devido ao fato de APEC não se constituir em um grupo homogêneo, mas em um conjunto de grupos relacionados a doenças específicas que mantêm heterogeneidades entre si. Em outras palavras, uma mesma “linha de corte”, se muito frouxa, pode incluir linhagens AFEC no grupo de APEC, se muito rígida, pode incluir como AFEC linhagens que na verdade são APEC.

Dados de outros pesquisadores apontam na mesma direção dos resultados obtidos neste trabalho, corroborando-o. Rodriguez-Siek e colaboradores (2005) encontraram uma diferença significativa na distribuição de genes associados à virulência entre linhagens relacionadas a duas síndromes clínicas distintas, septicemia e celulite, sugerindo a existência de subgrupos diferentes associados às diferentes doenças. Monkady *et al.* (2005), comparando seus resultados com aqueles obtidos por Stocki *et al.* (2002), observou que duas linhagens do mesmo sorogrupo (O2), uma associada com septicemia e outra com celulite, diferiam no número de seqüências de DNA associadas com virulência, sugerindo que linhagens septicêmicas aparentavam ter adquirido um conjunto maior de fatores de virulência.

Portanto, diferenças entre linhagens associadas a diferentes síndromes clínicas parecem constituir um fato, não apenas verificado no que concerne a genes de virulência (Stocki *et al.*, 2002; Monkady *et al.*, 2005; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005), mas também com base em traços fenotípicos, como adesão e letalidade, conforme demonstrado neste trabalho.

As linhagens septicêmicas, embora não aparentam constituir um grupo, por se sobreporem a linhagens de onfalite e síndrome da cabeça inchada, demonstram pequeno

grau de sobreposição com linhagens AFEC, como pode ser observado pelos resultados da análise estatística e da rede complexa, o que é consistente com a discriminação entre linhagens APEC e AFEC encontrada por outros grupos (Rodriguez-Siek *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2008) e corrobora a idéia de linhagens APEC não serem oportunistas, mas constituírem um grupo com genoma e maquinaria celular adaptados à patogenicidade.

Por outro lado, o padrão disperso de distribuição das linhagens associadas à septicemia deve ser realçado devido ao fato de amostras septicêmicas serem constantemente selecionadas para estudos com linhagens de *E. coli* aviárias comprometidos com identificação do patótipo APEC. Uma vez que este grupo patogênico, dentre os grupos testados neste trabalho, aparenta ser aquele com maior diversidade, a escolha deste grupo sozinho para os estudos pode ser um obstáculo, embora sua caracterização seja fundamental, para determinação do patótipo APEC.

Apesar de nossos resultados não serem conclusivos em relação à natureza das amostras septicêmicas, uma vez que elas não formaram um grupo coeso, é possível fazer algumas considerações. O padrão disperso encontrado poderia ser explicado pelo fato de que o conjunto de fatores associados com septicemia (isto é, o conjunto de fatores responsáveis pela patogênese associada a esta doença), compartilhado por estas linhagens, não foi estudado aqui. Caso tais dados estivessem incluídos no estudo, gerariam coesão do grupo. Neste caso, assim que forem identificados tais fatores, as amostras septicêmicas serão agrupadas por sua presença, formando um subgrupo distinto de APEC associado à septicemia. Esta explicação parece improvável, uma vez que para os outros dois grupos, onfalite e síndrome da cabeça inchada, os quais se apresentaram como grupos mais coesos, foram estudadas as mesmas características, e mesmo assim os grupos apresentaram alguma coesão. Uma explicação alternativa, portanto, seria a de que mais de um subgrupo ou subpatótipo dentro de APEC podem gerar uma condição patológica de septicemia, dependendo da evolução do quadro clínico e/ou das condições imunológicas do hospedeiro e/ou presença de infecções primárias e/ou presença de traços de virulência específicos nas linhagens, os quais permitem adesão a diversos tecidos, uma vez que linhagens septicêmicas empregadas em estudos de APEC são retiradas de vários sítios infecciosos. Neste caso, por definição, linhagens septicêmicas não formariam um único grupo homogêneo, mas seriam uma miscelânea de linhagens associadas a diferentes grupos de

doenças. De fato, em humanos, mais de um patótipo de ExPEC, como UPEC e NMEC podem causar septicemia. (Kaper *et al.*, 2004).

As análises estatísticas empregadas neste trabalho não determinam o número “natural” de grupos dentro da população, o que é fruto de interpretação dos dados com base nas similaridades entre amostras. Entretanto, a rede complexa, diferente da estatística multivariada empregada, revelou uma estrutura baseada em três grupos ou módulos, o que indica que a população de APEC deve estar mesmo estruturada, uma vez que um dos módulos é composto basicamente por linhagens AFEC. Assim, caso o grupo de APEC não estivesse estruturado em diferentes subgrupos, seria esperado haver apenas mais um módulo, contendo todas as APEC, de forma que haveria no total apenas dois módulos, um composto por AFECs e um por APECs. Não foi o que se observou. A rede revelou a existência de três módulos: dois módulos associados majoritariamente a linhagens APEC – além do módulo composto por linhagens AFEC – um onde está alocada a maioria das linhagens de onfalite e outro onde está alocada a maioria das linhagens de síndrome da cabeça inchada. As aparentes diferenças entre os resultados obtidos pela análise multivariada e pela rede podem ser explicadas pelo fato de que a rede, embora não seja um método hierárquico, associa obrigatoriamente uma linhagem a um módulo, de forma que diferenças entre linhagens de um mesmo módulo não podem ser visualizadas e são subestimadas. A estatística multivariada, apesar de não identificar grupos, permite vislumbrar que as amostras de onfalite estão próximas das comensais, mas que as amostras de síndrome da cabeça inchada, embora mantenham diversidade entre si, estão mais afastadas das linhagens AFEC e de onfalite. E a grande diversidade das linhagens septicêmicas não é visualizada na rede tão bem quanto é na análise multivariada, embora tais linhagens estejam presentes nos três módulos.

O grupo das amostras de síndrome da cabeça inchada demonstrou-se bastante coeso e distante das linhagens comensais e de onfalite. As linhagens de síndrome da cabeça inchada apresentaram a maior incidência de genes detectados por PCR relacionados a adesinas, captação de ferro e ilhas de patogenicidade, alta capacidade de adesão em células HeLa, Hep-2 e epiteliais de traquéia. Além disso, é um grupo majoritariamente constituído por linhagens de filogrupos de *E. coli* associados à patogenicidade (B2+D) e com alta patogenicidade nos testes de LD₅₀ (apenas 3 amostras septicêmicas apresentaram

capacidade de infecção mais alta que as amostras de síndrome da cabeça inchada). Dessa forma, há uma forte indicação de que se trata de um grupo de linhagens adaptadas à patogenicidade, com um sítio de infecção específico e com características genotípicas e fenotípicas bem delimitadas.

Como foi possível observar com os resultados, as amostras de onfalite e comensais (ou AFEC) foram aquelas que apresentaram maior similaridade. Especificamente o algoritmo K-means indicou resultados interessantes. Esse algoritmo, ao contrário do algoritmo empregado na rede complexa, não identifica a quantidade de grupos “naturais” existentes em uma dada população. É preciso informar essa quantidade e a partir desse dado ele aloca as diferentes linhagens estudadas em um dos grupos. Quando se determina dois grupos, o algoritmo aloca todas as linhagens de onfalite e comensais (ou AFEC) em um único grupo e no outro ele aloca todas as linhagens de síndrome da cabeça inchada. Aproximadamente metade das amostras septicêmicas são alocadas em cada um dos grupos. Já com três grupos, o resultado é completamente diferente: 90% das linhagens comensais (ou AFEC) ficam em um grupo e aproximadamente 82% das linhagens de onfalite são alocadas em outro, sendo a sobreposição entre os dois grupos muito pequena. Neste caso, com três grupos, mais de 90% das linhagens de síndrome da cabeça inchada são alocadas em um grupo a parte, em que não há nenhuma linhagem comensal (AFEC) e nenhuma linhagem de onfalite. As linhagens septicêmicas são distribuídas igualmente dentre os três grupos. Conclui-se, deste teste, que dependendo do nível de resolução que adotamos, as amostras de onfalite (O) e comensais (N) podem ser alocadas em um mesmo grupo ou em grupos separados. Para compreender quais as características que diferenciam estes dois grupos, é possível utilizar os resultados da análise de componente principal. Segundo esta análise, os dados que mais contribuem para a separação entre os grupos de onfalite e comensais são os ensaios de adesão e a presença do gene *IpfaO154*, relacionado à adesão. Ainda de acordo com essa análise, os dados que mais contribuem para a similaridade entre estes dois grupos são os filogrupos (A, B1, B2 e D) e os níveis de dose letal (LD_{50}). Uma possível explicação biológica para o fato de linhagens comensais e de onfalite diferirem no que diz respeito à adesão seria o fato de as vias de infecção serem distintas. Linhagens de onfalite não precisam infectar o trato digestivo, podendo infectar o ovo, sendo capazes de atravessar a casca quando ainda “mole”. O sítio de infecção das linhagens de onfalite é o

saco da gema do ovo, enquanto amostras comensais infectam sítios intestinais. Portanto, faz sentido que as linhagens sejam diferentes em relação ao padrão de adesão, ainda que apresentem outras características genéticas e fenotípicas semelhantes, como os filogrupos e as doses de letalidade. Estas duas características são em geral associadas à patogenicidade. Assim, linhagens de onfalite talvez sejam linhagens oportunistas, conforme já apontado por Silveira *et al.* (2002a, 2002b), ou ainda podem constituir um grupo patogênico de baixa letalidade (característica que o aproxima de linhagens AFEC) associado a um sítio de infecção bastante específico, o qual requer uma via de infecção particular (característica que diferencia o grupo das linhagens AFEC). Neste cenário, linhagens de onfalite não seriam oportunistas, mas especialistas associados a um nicho específico, o saco da gema dos ovos.

Acredita-se que a proteína hemaglutinina sensível a temperatura (*tsh*) contribua para os estágios iniciais da infecção, incluindo colonização dos sacos aéreos, mas não estando associada à subsequente infecção generalizada (Dozois *et al.*, 2000). Nesse contexto, é relevante o fato de que nenhuma linhagem de onfalite (O) e apenas três dentre trinta amostras AFEC tiveram o gene *tsh* detectado por PCR. Isso reforça a possibilidade de linhagens de onfalite serem patógenos especialistas. Infectam o saco da gema do ovo, sendo transmitidas no momento da postura dos ovos, de forma que não seria necessária a proteína *tsh*, uma vez que não há colonização dos sacos aéreos. O mesmo argumento também se aplicaria a hipótese de patógeno oportunista.

Os resultados obtidos por Johnson e colaboradores (2008) corroboram nosso trabalho. No citado trabalho, as linhagens não foram separadas de acordo com as doenças que causavam, ou os sítios de onde foram isoladas (os quais refletem as doenças). Genes de virulência foram utilizados para classificar as amostras APEC. De acordo com os resultados, as amostras APEC foram separadas em dois grupos, um de baixa e um de alta patogenicidade. Muitas amostras APEC foram erroneamente classificadas como AFEC por apresentarem uma pequena quantidade de gene de virulência e os pesquisadores sugeriram que estas seriam linhagens oportunistas. É possível conjecturar que essa organização das amostras APEC em diferentes grupos, com patogenicidade crescente, reflita a estrutura populacional que sugerimos existir e que o padrão de distribuição dos genes de virulência

não seja aleatório, mas relacionado aos diferentes subpatótipos existentes dentro de APEC e associados às diferentes patologias causadas.

Estes resultados são compatíveis com uma premissa bastante simples, porém relevante, de que aves constituem-se em hospedeiros biologicamente tão complexos quanto os seres humanos. Assim como seres humanos, oferecem diferentes nichos para organismos patogênicos. Uma vez que há muitos patótipos de *E. coli* associados com diferentes doenças em humanos, o mesmo poderia ser esperado para linhagens de *E. coli* aviárias. A aparente diferença no número de patótipos identificados poderia ser atribuída a maior quantidade de estudos com linhagens humanas.

Por fim, levando em conta os resultados apresentados neste trabalho e baseado no fato de que as diferenças entre os subgrupos de APEC são baseadas, dentre outras características, em proteínas associadas à membrana, como adesinas e sistemas de aquisição de ferro, seria interessante considerar estes subgrupos no desenvolvimento de vacinas, com o intuito de produzir vacinas com proteção cruzada, o que ainda não foi atingido com sucesso.

6. Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a população de linhagens *Escherichia coli* patogênicas para aves, APEC, deve estar estruturada em subgrupos – patótipos ou subpatótipos – os quais estão associados às doenças que as linhagens causam no hospedeiro, de forma que APEC não constitui um grupo homogêneo. Assim, podemos sugerir a existência de um subpatótipo associado à onfalite, com características de letalidade semelhantes as de linhagens AFEC, mas com um padrão de adesão diferente. Tal subpatótipo seria possivelmente composto por linhagens especializadas em um nicho específico, o saco da gema do ovo. Ainda, sugerimos a existência de um segundo subpatótipo, associado à síndrome da cabeça inchada, igualmente adaptado à patogenicidade, mas com características mais “agressivas” evidenciadas pelos altos índices de letalidade, grande número de genes de virulência, altos índices de adesão. É possível que outros subpatótipos possam ser identificados, associados a outras condições patológicas, como celulite, pericardite, perihepatite, peritonite, infecções do trato respiratório. Essa hipótese deve ser testada com linhagens extraídas de sítios dessas infecções.

Ainda, sugerimos que as linhagens associadas à septicemia não constituem um grupo homogêneo, mas uma miscelânea de linhagens que podem pertencer a diferentes subpatótipos e que em última instância geram a síndrome sistêmica (septicemia), devido a evolução do quadro clínico e/ou das condições imunológicas do hospedeiro e/ou presença de infecções primárias e/ou presença de traços de virulência específicos nas linhagens, os quais permitem adesão a diversos tecidos.

7. Referências Bibliográficas

- do Amaral, L.A. (2004) Drinking water as a risk factor to poultry health. *Rev Bras Cienc Avic* 6, 191–199.
- Amhaz, J.M., Andrade, A., Bando, S.Y., Tanaka, T.L., Moreira-Filho, C.A., and Martinez, M.B. (2004) Molecular typing and phylogenetic analysis of enteroinvasive *Escherichia coli* using the *fliC* gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 235: 259-264.
- Bethesda Research Laboratories (BRL) 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. Focus 8:9.
- Campos, T. A., Lago, J.C., Nakazato, G., Stehling, E. G., Brocchi, M., de Castro, A. F. P., Silveira, W. D. (2008a) Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). *Braz. j. vet. Res.* 28:533-540.
- Campos, T. A., Nakazato, G., Stehling, E. G., Brocchi, M., Silveira, W. D. (2008b). Clonal study of avian *Escherichia coli* strains by *fliC* conserved-DNA-sequence region analysis. *Braz. j. vet. Res.* 28:508-514
- Campos, T. A., Stehling, E. G., Ferreira, A., Brocchi, M., Castro, A. F. P., Simveira, W. D. (2005) Adhesion properties and fimbrial expression and PCR detection of adhesion-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 106:275-278.
- Caudry, S.D., and Stanisich, V.A. (1979) Incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* associated with frozen chicken carcasses and characterization of conjugative R plasmids derived from such strains. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 701-709.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. (2000) Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 66:4555-8
- Costerton, J.W. (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15: 137-140.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176: 2137-2142.

- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183: 2888-2896.
- Davey, M.E., and O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-867.
- Delicato E.R., de Brito B.G., Gaziri L.C., Vidotto M.C. (2003) Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis, *Vet. Microbiol.* 94 97–103.
- Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M. (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 30: 299-316.
- Dho-Moulin, M., Lafont, J.P., 1982. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.* 26, 787–797.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 414-424.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., and Curtiss, R., 3rd (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* 68: 4145-4154.
- Dziva, F., Stevens, M. P. (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37: 355-366
- Fantinatti, F., da Silveira, W. D., Castro, A. F. P. (1994) Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 41: 75-86.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269– 275

- Ginns, C.A., Benham, M.L., Adams, L.M., Whithear, K.G., Bettelheim, K.A., Crabb, B.S., and Browning, G.F. (2000) Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect Immun* 68: 1535-1541.
- Girvan, M., and M. E. J. Newman. 2002. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 7821–7826.
- Gross W. B. (1991) Colibacillosis. In: Disease of Poultry (Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W. Reid W. M., Yoder J. H. W., eds.) pp. 138-144. Iowa State University Press: Ames Iowa.
- Guimerà, R. and L. A. N. Amaral. 2005. Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature*. 433: 895-900.
- Guimerà, R., M. Sales-Pardo, and L. A. N Amaral. 2004. Modularity from fluctuations in random graphs and complex networks. *Phys. Rev. E*. 70: 025101.
- Gyles, C. L. (1994) *Escherichia coli*. In: Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, UK, pp. 237-259.
- Hacker, J., and Carniel, E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2: 376-381.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-679.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23: 1089-1097.
- Hanahan, D. (1985). in DNA Cloning: A Practical Approach. Glover, D. M. (ed.), Vol. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia.
- Johnson, J.R., and Russo, T.A. (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med* 139: 155-162.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3987-3996

- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., Nolan, L.K. (2007) The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes. *J. Bacteriol.* 3228–3236
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 123-140.
- Kariyawasam, S., Johnson, T.J., and Nolan, L.K. (2006a) The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect Immun* 74: 744-749.
- Kariyawasam, S., Johnson, T.J., Debroy, C., and Nolan, L.K. (2006b) Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Dis* 50: 405-410.
- Le Bouguenec, C. Archambaud, M. Labigne, A. (1997) Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1189-1193
- Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389.
- Levy, S.B., FitzGerald, G.B., and Macone, A.B. (1976) Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260: 40-42.
- Lloyd, AL., Rasko, D.A., and Mobley, H.L. (2007) Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 3532-3546.
- Marc, D., Dho-Moulin, M. (1996) Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. *J Med Microbiol* 44: 444-452
- Maurer, J.J., Brown, T.P., Steffens, W.L., Thayer, S.G. (1998) The Occurrence of Ambient Temperature-Regulated Adhesins, Curli, and the Temperature-Sensitive Hemagglutinin Tsh among Avian *Escherichia coli*. *Av Dis.* 42: 106-118

- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* 33:296–306
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J. (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* 186: 3086-3096.
- Miller, J.H. Experiments in molecular biology (1972). Col Spring Harbor Lab. Press.
- Mokady, D., Gophna, U., Ron, E.Z. (2005) Extensive Gene Diversity in Septicemic *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol.* 66-73
- Nakazato, G., de Campos, T. A, Lago, J.C., Brocchi, M., de Castro, A. F. P., Stehling, E. G., Silveira, W. D. (2007) Study of the adhesion and invasion capacities of an invasive avian pathogenic *Escherichia coli* strain (APEC) to in vitro cultivated Hep-2 cells. *Brazilian journal of morphological sciences.* 24(1):1-10.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313–322.
- Okeke, I. N., Scaletsky, I.C.A., Soars, E.H., Macfarlane, L.R., Torres, A.G., (2004) Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* *J Clin Microbiol* 42: 36-44
- O'Shea, Y.A., and Boyd, E.F. (2002) Mobilization of the *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction. *FEMS Microbiol Lett* 214: 153-157.
- Parreira, V.R., and Gyles, C.L. (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* 71: 5087-5096.
- Reed, L.J., Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., and Nolan, L.K. (2005) Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 36: 241-256.

- Runyen-Janecky, L.J., Reeves, S.A., Gonzales, E.G., Payne, S.M. (2003) Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo Iron Acquisition Systems to Iron Acquisition in Vitro and in Cultured Cells. *Infect Immun* 71: 1919-1928
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning – a Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, H. and Hensel, M. (2004) Pathogenic Islands in Bacterial Pathogenesis. *V Clin Microbiol Rev* 17: 14-56.
- Schmidt, H., Zhang, W.L., Hemmrich, U., Jelacic, S., Brunder, W., Tarr, P.I., Dobrindt, U., Hacker, J., Karch, H. (2000) Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 69:6863-73.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A.D., and Nataro, J.P. (2001) Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41: 983–997.
- Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K., and Karmali, M.A. (2005) Identification of four fimbria-encoding genomic islands that are highly specific for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157 strains. *J Clin Microbiol* 43: 3840-3850.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J. (1998) Prevalence of the "High-Pathogenicity Island" of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* Strains That Are Pathogenic to Humans *Infect Immun* 66: 480-485
- Silveira, W. D. Reis, E. R., Arns, C. W., Sircili, M. P., Fantinatti, F., Brocchi, M. (1998) Possible involvement of an outer membrane protein in the pathogenicity of a chicken septicemic *Escherichia coli* isolate. *Rev. Microbiol.* 29: 113-117.
- Silveira, W. D., Fantinatti, F., Castro, A. F. P. (1994) Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. *Rev. Brasil. Genet.* 17: 9-14.
- Silveira, W. D., Ferreira, A., Brocchi, M., Hollanda, L. M., Castro, A. F. P., Yamada, A. T., Lancellotti, M. (2002a) Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Mic.* 85:47-53.
- Silveira, W. D., Ferreira, A., Lancellotti, M., Barbosa, I. A. G. C. D., Leite, D. S., Castro, A. F. P., Brocchi (2002b). Clonal relationship among avian *Escherichia coli* isolates

- determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet. Mic.* 89:323-328.
- Silveira, W. D., Ferreira, A., Stehling, E. G., Lancellotti, M., Castro, A. F. P., Brocchi, M. (2003a) Clonal variability of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains determined by the repetitive extragenic palindromic (REP) polymerase chain reaction. Submetido à *Genet. Mol. Biol.*
- Silveira, W. D., Lancellotti, M., Ferreira, A., Solferini, V. N., Castro, A. F. P., Brocchi, M. (2003b) Determination of the clonal structure of avian *Escherichia coli* strains by isoenzyme and ribotyping analysis. *J. Vet. Med. B.*, 50-63-69.
- Skyberg, J.A., Johnson, T.J., Johnson, J.R., Clabots, C., Logue, C.M., and Nolan, L.K. (2006) Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun* 74: 6287-6292.
- Skyberg, J.A., Siek, K.E., Doetkott, C., and Nolan, L.K. (2007) Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol* 102: 548-554.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. (1994). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.*, 3rd edition. New York: Freeman.
- Soto, S.M., Jimenez de Anta, M.T., and Vila, J. (2006) Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 649-653.
- Sperandio V., Mellies J.L., Nguyen W., Shin S., Kaper J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:15196-201.
- Sperandio V., Torres A.G., Jarvis B., Nataro J.P., Kaper J.B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8951-6.
- Stehling, E. G., Campos, T. A., Ferreira, A., Silveira, W. D. (2003a) Adhesion and invasion characteristics of a septicaemic avian *Escherichia coli* (APEC) strain are plasmid mediated. *The J. Appl. Res. Vet. Mic.*, 27-36.

- Stehling, E. G., Yano, T., Brocchi, M., Silveira, W. D. (2003b) Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome. *Vet. Mic.*, 95:111-120.
- Stehling, E.G., Campos, T.A., Azevedo, V., Brocchi, M., Silveira, W.D. (2007). DNA sequencing of a pathogenicity-related plasmid of an avian septicaemic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Genet. Mol. Res.* 6: 231-237.
- Stehling, E.G., Campos, T.A., Brocchi, M., Azevedo, V. A.C., Silveira, W.D. (2008) The expression of an afimbrial adhesin of an avian septicaemic *Escherichia coli* strain is plasmid mediated. *The Journal of Veterinary Science*, 9(1):75-83.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., and Svabic-Vlahovic, M. (2004) Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 38: 428-432.
- Stewart, P. S. and J. W. Costerton (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276): 135-8.
- Stocki S.L., Babiuk L.A., Rawlyk N.A., Potter A.A., Allan B.J. (2002) Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis. *Microb Pathog.* 33(6):289-98.
- Szalo, I.M., Goffaux, F., Pirson, V., Piérard D., Ball, H., Mainil, J. (2002) Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res Microbiol.* 153:653-8.
- Toma, C., Espinosa, E.M., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M., Rivas, M. (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 42:4937-46.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in *Staphylococci*. *Mol Microbiol* 56: 836-844.
- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration

- activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49: 193-210.
- Walters M., Sircili M.P., Sperandio V. (2006) AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188:5668-81.
- Wang, X., de Boer, P.A.J., Rothfield, L.I., (1991) A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 10: 3363– 3372.
- Watnick, P.I., and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34: 586-595.
- Ye, C., Xu, J. (2001) Prevalence of Iron Transport Gene on Pathogenicity-Associated Island of Uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 Containing Shiga Toxin Gene. *J Clin Microbiol* 39: 2300-2305
- Zhao, S., Maurer, J.J., Hubert, S., De Villena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, L., and White, D.G. (2005) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol* 107: 215-224.